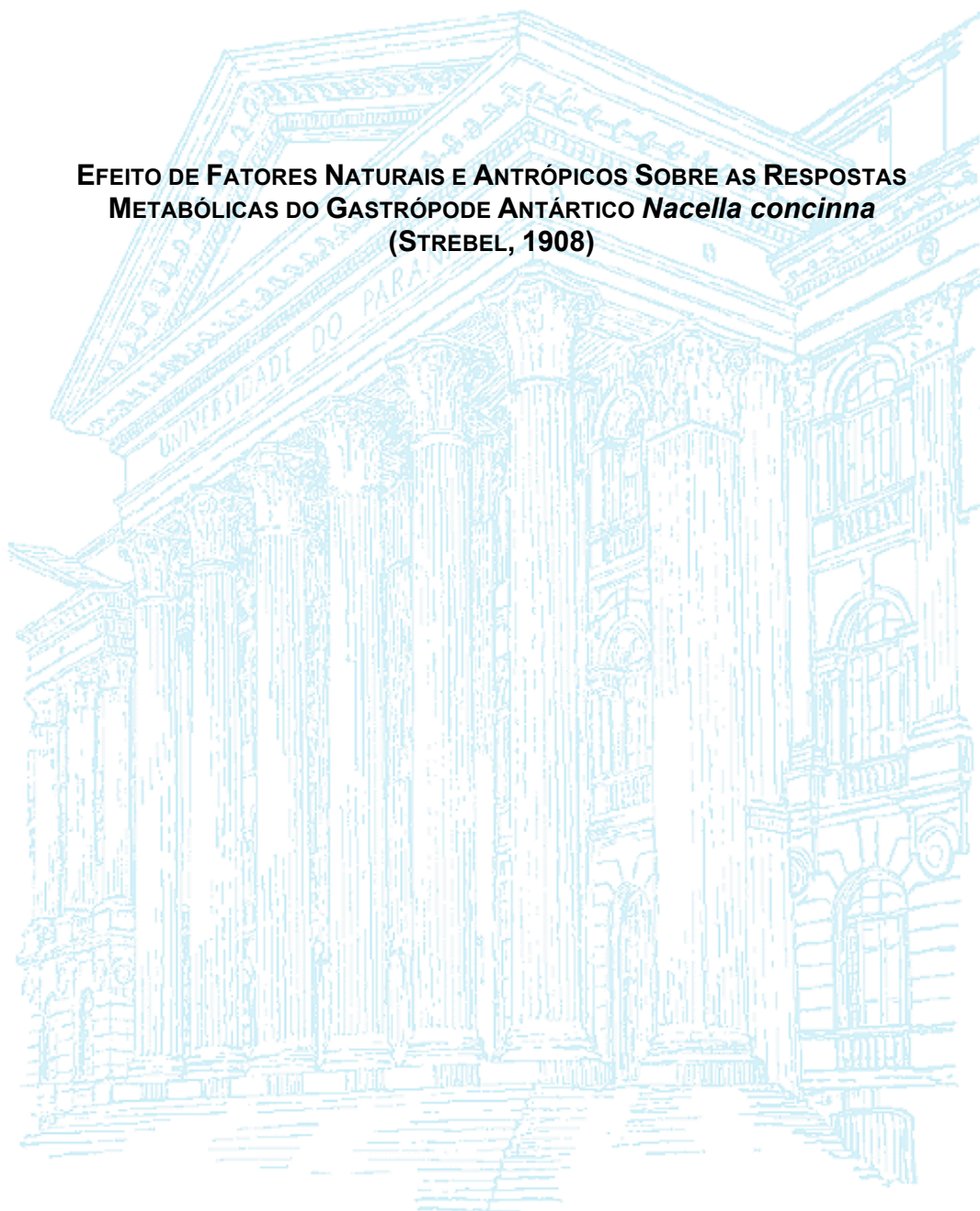


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA FEIJÓ DE OLIVEIRA

**EFEITO DE FATORES NATURAIS E ANTRÓPICOS SOBRE AS RESPOSTAS
METABÓLICAS DO GASTRÓPODE ANTÁRTICO *Nacella concinna*
(STREBEL, 1908)**



CURITIBA
2017

MARIANA FEIJÓ DE OLIVEIRA

**EFEITO DE FATORES NATURAIS E ANTRÓPICOS SOBRE AS RESPOSTAS
METABÓLICAS DO GASTRÓPODE ANTÁRTICO *Nacella concinna*
(STREBEL, 1908)**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucélia Donatti
Coorientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues

CURITIBA
2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Oliveira, Mariana Feijó de

Efeito de fatores naturais e antrópicos sobre as respostas metabólicas do gastrópode antártico *Nacella concinna* (Strebel, 1908). / Mariana Feijó de Oliveira. – Curitiba, 2017.

169 p. : il. ; 30cm.

Orientador: Lucélia Donatti

Coorientador: Edson Rodrigues

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Gastropode 2. Antártida 3. Salinidade 4. Esgotos 5. Metais I.
Título II. III. Donatti, Lucélia IV. Rodrigues, Edson V. Universidade
Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 564.3

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Profa. Dra. Lucélia Donatti
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR

aprovado

Profa. Dra. Helena Passeri Lavrado
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

aprovado

Profa. Dra. Lia Sumie Nakao
Universidade Federal do Paraná - UFPR

aprovada

Profa. Dra. Juliana Bello Baron Maurer
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

aprovado

Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Universidade Federal do Paraná - UFPR

aprovado

E tendo como suplente,

Profa. Dra. Marisa Fernandes Castilho
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir a candidata **Mariana Feijó de Oliveira**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Efeitos de fatores naturais e antrópicos sobre as respostas metabólicas do gastrópode antártico *Nacella concinna* (Strebel, 1908)", são de parecer favorável à ~~aprovação~~ da acadêmica, habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular. A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.



Curitiba, 20 de Fevereiro de 2017

Prof. Dr. Andrea Senff Ribeiro
Coord. do Programa de Pós-Graduação
Em Biologia Celular e Molecular
Matr./UFPR 200261

Centro Politécnico
Rua Heráclito Domingos dos Santos s/n | Jardim das Américas
Caixa Postal: 19031 | CEP: 81.531-980 | Curitiba | Paraná | Brasil
Fone: 55.41.3361-1676

DEDICO

*À Ana, Tatiana, Terezinha e Jaime. Pessoas maravilhosas, cujo carinho,
apoio, amor e incentivo me deram coragem para seguir em frente.
Amo vocês!*

*“Quando a última árvore tiver caído,
quando o último rio tiver secado,
quando o último peixe for pescado,
o homem entenderá que dinheiro não se come.”
Provérbio indígena*

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.”
Arthur Schopenhauer*

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná pelo apoio no decorrer do doutorado.

À Universidade de Taubaté, por ceder o Laboratório de Bioquímica para a análise das amostras que compõem o presente estudo.

À Marinha do Brasil, pela contribuição na coleta e manutenção dos bioensaios, bem como no transporte do material biológico para o Brasil.

À SECIRM e PROANTAR pelo apoio logístico durante todas as Operações Antárticas.

Ao CNPq, Ministério de Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação (MCTIC), e Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo fomento indispensável para a realização desse trabalho.

À CAPES pela concessão de bolsa durante o curso de doutorado.

Ao INCT-APA pelo apoio na coleta das amostras utilizadas neste trabalho.

Ao Arsenal de Marinha do Rio de Janeiro, cujo profissionalismo e competência foram essenciais para a execução da presente tese.

Aos Grupos Base presentes nas Operações Antárticas XXIX, XXX e XXXII pelo comprometimento e apoio na coleta e execução dos bioensaios. Especialmente, gostaria de agradecer aos chefes Daros e Muthz, que apoiaram excepcionalmente nosso trabalho, em todos os aspectos, sempre dispostos a resolver os problemas constantemente presentes em um ambiente tão adverso quanto a Antártica.

À Professora Dr^a. Lucélia Donatti, pela orientação e apoio para a realização desse trabalho.

Ao Professor Dr. Edson Rodrigues, por ser sempre um ótimo professor, sempre disposto a ajudar. Obrigada pela compreensão e apoio durante tantos anos, por me abrir portas para grandes oportunidades. Obrigada por todo o conhecimento (científico, profissional e pessoal) passado.

À Professora Dr^a. Helena Passeri Lavrado, pelo auxílio estatístico e preciosas sugestões que certamente engrandeceram a presente tese.

Aos professores Ciro A. de O. Ribeiro, Lia Nakao e Juliana B. B. Maurer pelas valiosas sugestões.

Ao Professor Dr. Francisco Filipak Neto pelas excelentes recomendações nos relatórios anuais, que engrandeceram a presente tese.

Ao meu marido, amigo, parceiro e grande companheiro Jaime, por acreditar em mim (geralmente mais do que eu mesma), pela compreensão, carinho, conselhos e incentivo, mas principalmente, por segurar as pontas nas minhas longas ausências.

À minha família, por estar sempre ao meu lado, me incentivando e fazendo o possível para que eu possa realizar meus sonhos. Agradeço às pessoas da minha família que, infelizmente, hoje não estão mais ao meu lado, mas que foram muito importantes em minha vida: vô Feijó, vô Didi, tia Yayá, pai Coelho e vô Terezinha. Sinto muito a falta de vocês.

À minha mãe Ana, mulher guerreira, que sempre me incentivou e acreditou em mim, sempre trabalhou arduamente, sem nunca medir esforços para me ajudar a realizar meus sonhos. Hoje estou aqui, sou o que sou, porque você acreditou em mim, mãe! E muito obrigada por isso!

À minha irmã Tatiana, outra guerreira, que sempre me apoiou, e ajudou em tudo, em todos os momentos. Obrigada pela paciência!

À melhor avó que alguém poderia ter: Terezinha, que sempre se orgulhou de mim e me apoiou. Sinto muito sua falta.

À mãe Alice, minha mãe de coração, que sempre esteve disposta a ajudar, com carinho, amor e dedicação.

Aos tios (André, José Guilherme e Júlio), tias (Cristina e Anne) e primas (Maria Rita, Bárbara, Ana Júlia, Juliana e Márcia) pelo apoio e carinho.

Aos sogro e sogra Sansão e Inez, pessoas maravilhosas, que sempre estiveram ao meu lado com carinho e paciência.

Ao amigo Edson Rodrigues Júnior (Edinho), pela grande contribuição, que foi essencial para a realização desse trabalho, pelo auxílio durante a coleta e análise das amostras, pelos valiosos conselhos e apoio, sempre com disposição e boa vontade em me ajudar e tranquilizar nos momentos difíceis.

Aos amigos Camila Carvalho e Gustavo do Carmo por sempre estarem ao meu lado, me ouvirem, ajudarem e apoiarem. Obrigada pelo companheirismo e amizade há tantos anos.

À amiga Kelly Leal, pela paciência, apoio, auxílio, disposição e boa vontade em ajudar durante tantos anos!

Aos amigos Ronaldo Merenda, Juliana Santos, Gustavo Salles e Maria Tereza por sempre me ouvirem e incentivarem. Obrigada pelos bons momentos de risadas, foram valiosos.

Aos amigos antárticos Tânia Zaleski, Josilene Silva, Amanda Spera, Felipe Nóbrega, André (Porco), Wagner Borges, Adair Dillman, Bernardo, Leonardo Tanaka (ESG), Ricardo Silva (Banzo), Jarba Salmont Jr. (Doc) e Carlos Magno. Pessoas excepcionais, com as quais tive o privilégio de conviver na Operação Antártica XXXII, e que me auxiliaram tanto profissionalmente, quanto pessoalmente.

Às Professoras do Laboratório de Bioquímica da Universidade de Taubaté, e grandes amigas, Dr^a. Gannabathula Sree Vani e Dr^a. Cecília Suda, por estarem sempre dispostas a me ensinar, passando as valiosas dicas de anos de experiência. É maravilhoso ter vocês como amigas e companheiras de trabalho.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização dessa tese.

RESUMO

O gastrópode antártico *Nacella concinna* habita a zona entremarés da Antártica, uma região naturalmente instável, que apresenta flutuações termo-salinas diárias, além de ser vulnerável à ação de contaminantes de origem antrópica, como o despejo de efluentes de esgoto de estações científicas e navios. Somado a isso, os organismos que habitam essa região precisam lidar com os níveis naturalmente elevados de metais pesados. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar as respostas fisiológicas de *N. concinna* à variações termo-salinas de curto prazo, bem como verificar o efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) sobre o metabolismo energético, nitrogenado e defesa antioxidante desse molusco. Também objetivamos avaliar o efeito direto de metais pesados sobre a atividade da arginase branquial e do pé muscular de *N. concinna*, bem como a distribuição tecidual e subcelular dessa enzima. Os bioensaios de temperatura e salinidade, ao longo do tempo, mostraram que o aquecimento e hipossalinidade modulam a defesa antioxidante, basicamente os níveis de SOD e G6PDH, de forma tecido-específica. No estresse hipossalino e térmico de curta duração, a defesa antioxidante glandular de *N. concinna* foi eficaz em prevenir lesões oxidativas em lipídeos e proteínas. O aquecimento é capaz de modular positivamente o metabolismo anaeróbico do pé muscular desse gastrópode. Contudo, nas brânquias, enquanto o aquecimento não modulou as enzimas do metabolismo energético, a hipossalinidade induziu resposta metabólica aeróbica. O estresse hipossalino elevou os níveis de AST e GDH no pé muscular, sugerindo a participação dessas enzimas na regulação osmótica desse tecido. Também foram observadas interações entre temperatura, salinidade e tempo, capazes de modular os níveis das enzimas analisadas nos três tecidos. Os níveis de ARG cerca de duas vezes superiores aos de ODH no pé muscular de *N. concinna* sugere a participação de ARG no catabolismo de L-arginina, durante a decomposição do “tampão energético” fosfo-L-arginina. Apesar de ser considerado um bom biomonitor, a complexidade das respostas metabólicas de *N. concinna*, frente ao aquecimento e hipossalinidade, sugerem cautela na utilização dessas respostas como biomarcadores de mudanças naturais e antrópicas. Em relação ao efeito do esgoto, a indução de SOD, GST e CAT na glândula digestiva foi eficaz em prevenir danos oxidativos em lipídeos, mas não em proteínas na diluição de esgoto a 0,05% (v/v). A exposição ao esgoto foi capaz de elevar o potencial gerador de ATP aeróbico e anaeróbico das brânquias. Já no pé muscular o esgoto modulou positivamente a PFK, enzima reguladora da via glicolítica. Os estudos com metais pesados mostraram que as arginases branquial e do pé muscular de *N. concinna* apresentam características cinéticas distintas quanto ao K_M e ação de cátions de metais pesados. Tanto a arginase branquial como a do pé muscular estão localizadas prioritariamente na fração citosólica dos tecidos. Também ficou evidente que as arginases das brânquias e do pé muscular são resistentes à inibição por cobre, o que sugere uma adaptação metabólica desse gastrópode, que pode ter contribuído para a ocupação de nichos naturalmente ricos em metais pesados.

Palavras-chave: *Nacella concinna*. Antártica. Temperatura. Salinidade. Esgoto. Metais.

ABSTRACT

The antarctic gastropod *Nacella concinna* inhabits the intertidal zone of Antarctica, a naturally unstable region that exhibits daily thermo-saline fluctuations, besides being vulnerable to the action of contaminants of anthropic origin, such as the discharge of sewage effluents from scientific stations and ships. In addition, organisms living in this region must deal with naturally high levels of heavy metals. In this context, the present study aimed to evaluate the physiological responses of *N. concinna* to short-term thermo-saline variations, as well as to verify the effect of the Antarctic Station Comandante Ferraz (EACF) sewage on energy and nitrogen metabolism and antioxidant defense of this mollusk. We also aimed to evaluate the direct effect of heavy metals on the activity of the branchial and foot muscle arginase of *N. concinna*, as well as the tissue and subcellular distribution of this enzyme. Temperature and salinity bioassays, over time, have shown that heating and hyposalinity modulate the antioxidant defense, basically the levels of SOD and G6PDH, in a tissue-specific way. In short-term hyposaline and thermal stress, the antioxidant glandular defense of *N. concinna* was effective in preventing oxidative lesions in lipids and proteins. Heating is able to positively modulate the anaerobic metabolism of the foot muscle of this gastropod. However, in the gills, while heating did not modulate the enzymes of energy metabolism, hyposalinity induced an aerobic metabolic response. Hyposaline stress increased AST and GDH levels in the foot muscle, suggesting the participation of these enzymes in the osmotic regulation of this tissue. It was also observed interactions between temperature, salinity and time capable of modulating the levels of the enzymes analyzed in the three tissues. ARG levels about twice higher than that of ODH in the foot muscle of *N. concinna* suggest the participation of ARG in L-arginine catabolism during the decomposition of the phospho-L-arginine "energy buffer". In spite of being considered a good biomonitor, the complexity of *N. concinna* metabolic responses to heating and hyposalinity suggests caution in the use of these responses as biomarkers of natural and anthropogenic changes. Regarding the effect of the sewage, the induction of SOD, GST and CAT in the digestive gland was effective in preventing oxidative damage in lipids, but not in proteins in the dilution of 0.05% (v/v) of sewage. Exposure to the sewage was able to raise the aerobic and anaerobic ATP generating potential of the gills. In the foot muscle, the sewage positively modulated PFK, a glycolytic pathway regulating enzyme. Studies with heavy metals have shown that the branchial and foot muscle arginases of *N. concinna* have different kinetic characteristics regarding K_M and action of heavy metal cations. Both the branchial and foot muscle arginases are located primarily in the cytosolic fraction of the tissues. It was also evident that the arginases of the gills and of the foot muscle are resistant to inhibition by copper, suggesting a metabolic adaptation of this gastropod, which may have contributed to the occupation of niches naturally rich in heavy metals.

Keywords: *Nacella concinna*. Antarctica. Temperature. Salinity. Sewage. Metals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Isolamento físico do oceano austral pela Corrente Circumpolar Antártica (ACC).	23
Figura 2. Localização geográfica da Ilha Rei George e da Área Especialmente Gerenciada da Baía do Almirantado (ASMA#1).....	26
Figura 3. As diferentes condições encontradas na zona entremarés na Antártica	32
Figura 4. Gastrópode <i>Nacella concinna</i> aderido às rochas da zona entremarés no período de maré baixa em Punta Plaza, Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Arquipélago das Shetlands do Sul, Antártica.....	37
Figura 5. Enzimas utilizadas como marcadores do metabolismo energético e nitrogenado.	46
Figura 6. Enzimas utilizadas como marcadores da defesa antioxidante e marcadores não enzimáticos de lesão oxidativa.....	48
Figura 7. Localização geográfica de Punta Plaza	51
Figura 8. Detalhes anatômicos de <i>Nacella concinna</i>	53
Figura 9. Banho-maria ultratermostático com circulação interna de água..	54
Figura 10. Esquema do modelo experimental dos bioensaios termo-salinos.	55
Figura 11. Desenho experimental dos ensaios com o efluente de esgoto da estação Comandante Ferraz.....	56
Figura 12. Efeito da concentração de fosfofrutoquinase (PFK) de <i>Nacella concinna</i> sobre a velocidade da reação.....	70
Figura 13. Reação de fosforilação da frutose-6-fosfato (F-6-P) em frutose-1,6-bisfosfato (F-1,6-P ₂), catalisada pela fosfofrutoquinase (PFK)	71
Figura 14. Estabilidade térmica da arginase hepática de <i>Notothenia coriiceps</i>	74
Figura 15. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e do tempo (To) de aclimação sobre os níveis de enzimas da defesa antioxidante das brânquias de <i>Nacella concinna</i>	77
Figura 16. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e do tempo (To) de aclimação sobre os níveis de enzimas da defesa antioxidante do pé muscular de <i>Nacella concinna</i>	78
Figura 17. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e do tempo (To) de aclimação sobre os níveis de enzimas da defesa antioxidante da glândula digestiva de <i>Nacella concinna</i>	79

Figura 18. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e do tempo (To) de aclimação sobre os níveis de lipoperoxidação (LPO) e proteínas carboniladas (PCO) da glândula digestiva de <i>Nacella concinna</i> .	80
Figura 19. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e do tempo (To) de aclimação sobre os níveis de enzimas do metabolismo energético branquial de <i>Nacella concinna</i> .	81
Figura 20. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e tempo (To) de aclimação sobre os níveis de enzimas do ciclo do ácido cítrico de brânquias de <i>Nacella concinna</i> .	82
Figura 21. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e tempo (To) de aclimação sobre os o metabolismo nitrogenado branquial de <i>Nacella concinna</i> .	83
Figura 22. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e do tempo (To) de aclimação sobre os níveis de enzimas glicolíticas do pé muscular de <i>Nacella concinna</i> .	84
Figura 23. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e do tempo (To) de aclimação sobre o metabolismo anaeróbio do pé muscular de <i>Nacella concinna</i> .	85
Figura 24. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e do tempo (To) de aclimação sobre os níveis de enzimas do ciclo do ácido cítrico do pé muscular de <i>Nacella concinna</i> .	87
Figura 25. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e do tempo (To) de aclimação sobre os níveis de enzimas do metabolismo nitrogenado do pé muscular de <i>Nacella concinna</i> .	88
Figura 26. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os níveis das enzimas da defesa antioxidante da glândula digestiva de <i>Nacella concinna</i> .	89
Figura 27. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os marcadores de lesão oxidativa da glândula digestiva de <i>Nacella concinna</i> .	90
Figura 28. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os níveis das enzimas da defesa antioxidante das brânquias de <i>Nacella concinna</i> .	91
Figura 29. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os níveis das enzimas da defesa antioxidante do pé muscular de <i>Nacella concinna</i> .	92
Figura 30. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os níveis das enzimas da via glicolítica das brânquias de <i>Nacella concinna</i> .	93

Figura 31. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os níveis das enzimas do ciclo do ácido cítrico das brânquias de <i>Nacella concinna</i>	94
Figura 32. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os níveis de arginase (ARG) das brânquias de <i>Nacella concinna</i>	95
Figura 33. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os níveis das enzimas da via glicolítica do pé muscular de <i>Nacella concinna</i>	96
Figura 34. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os níveis das enzimas do metabolismo anaeróbico do pé muscular de <i>Nacella concinna</i>	97
Figura 35. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os níveis das enzimas do ciclo do ácido cítrico do pé muscular de <i>Nacella concinna</i>	98
Figura 36. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os níveis das enzimas do metabolismo nitrogenado do pé muscular de <i>Nacella concinna</i>	99
Figura 37. Distribuição tecidual e localização subcelular das arginases de <i>Nacella concinna</i>	99
Figura 38. Curva de saturação das arginases branquial e do pé muscular de <i>Nacella concinna</i> por L-arginina.....	100
Figura 39. Efeito de cátions metálicos sobre a atividade da arginase branquial de <i>Nacella concinna</i>	102
Figura 40. Efeito de cátions metálicos sobre a atividade da arginase do pé muscular de <i>Nacella concinna</i>	103
Figura 41. Defesa antioxidante de <i>Nacella concinna</i> durante o estresse térmico e hipossalino.....	105
Figura 42. Níveis de enzimas do metabolismo energético anaeróbico e nitrogenado do pé muscular de <i>Nacella concinna</i> , do referencial da natureza, determinados no presente estudo.....	112
Figura 43. Metabolismo energético e nitrogenado do pé muscular de <i>Nacella concinna</i> durante o estresse térmico e hipossalino	115
Figura 44. Metabolismo energético e nitrogenado branquial de <i>Nacella concinna</i> durante o estresse térmico e hipossalino.	117
Figura 45. Defesa antioxidante de <i>Nacella concinna</i> durante a exposição ao esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF)..	121
Figura 46. Metabolismo energético e nitrogenado de <i>Nacella concinna</i> durante a exposição ao esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF).	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito de metais pesados sobre atividade da arginase branquial (NC-B) e do pé muscular (NC-M) do gastrópode *Nacella concinna* (presente estudo), bivalve *Dreissena polymorpha* (DP) (TORMANEN, 1997) e *Laternula elliptica* (LE) (RODRIGUES *et al.*, 2009). 131

Tabela 2. Níveis de alguns metais pesados ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco) no rim (LE-R) e músculo (LE-M) de *Laternula elliptica* (AHN *et al.*, 1996); pé muscular (NC-M) (CURTOSI *et al.*, 2010) e brânquias (NC-B) (WEIHE *et al.*, 2010) de *Nacella concinna* e pool dos tecidos moles do bivalve *Dreissena polymorpha* (DP) (ALCARAZ *et al.*, 2011) 132

Tabela 3. Efeito de metais sobre a atividade argininolítica do pé muscular de *Nacella concinna*. 133

Tabela 4. Efeito de metais sobre a atividade argininolítica branquial de *Nacella concinna*. 134

LISTA DE ABREVIATURAS

α -KA	α -cetoácido (<i>α-keto acid</i>)
α -KG	α -cetoglutarato (<i>α-ketoglutarate</i>)
μ L	Microlitro
μ mol	Micromol
ACC	Corrente Circumpolar Antártica (<i>Antarctic Circumpolar Current</i>)
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ADH	Alanopina Desidrogenase (<i>Alanopine Dehydrogenase</i>)
Ala	Alanina
ALT	Alanina Aminotransferase
AMP	Adenosina Monofosfato
AOA	Oxaloacetato
AST	Aspartato Aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
ARG	Arginase
Arg	L-Arginina
ASMA	Área Antártica Especialmente Gerenciada (<i>Antarctic Specially Managed Area</i>)
ATP	Adenosina Trifosfato
BCA	Ácido Bincicônico (<i>Bicinchoninic Acid</i>)
BHT	Hidroxitolueno Butilado (<i>Butylated Hydroxytoluene</i>)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Catalase
CDNB	1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno
CIRM	Comissão Interministerial para os Recursos do Mar
Cit	Fração Citosólica
cm	Centímetro
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CS	Citrato Sintase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina (<i>2,4-Dinitrophenylhydrazine</i>)
DTNB	Ácido 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoico (<i>5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid</i>)

DTT	Ditiotreitol
EACF	Estação Antártica Comandante Ferraz
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>)
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
F-1,6-P ₂	Frutose-1,6-bisfosfato (<i>Fructose 1,6-bisphosphate</i>)
F-6-P	Frutose-6-fosfato (<i>Fructose-6-phosphate</i>)
FAPERJ	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
FOX	<i>Ferrous Oxidation in Xylenol Orange</i>
g	Grama ou aceleração da gravidade
G-6-P	Glicose-6-fosfato (<i>Glucose-6-Phosphate</i>)
G6PDH	Glicose-6-fosfato Desidrogenase (<i>Glucose-6-phosphate Dehydrogenase</i>)
GAP	Gliceraldeído-3-fosfato (<i>Glyceraldehyde-3-phosphate</i>)
GDH	Glutamato Desidrogenase (<i>Glutamate Dehydrogenase</i>)
Gli	Glicina
Glu	Glutamato
α-GDH	Glicerolfosfato desidrogenase (<i>Glycerolphosphate dehydrogenase</i>)
GPx	Glutational Peroxidase
GR	Glutational Redutase
GSH	Glutational Reduzida
GSSG	Glutational Oxidada
GST	Glutational S-Transferase
h	hora
HIFα	Fator Induzido por Hipóxia-α (<i>Hypoxia-inducible Factor-α</i>)
HK	Hexoquinase (<i>Hexokinase</i>)
HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IAATO	Associação Internacional das Operadoras de Turismo Antártico (<i>International Association of Antarctica Tour Operators</i>)
IDH	Isocitrato Desidrogenase (<i>Isocitrate Dehydrogenase</i>)
IDP	Inosina Difosfato
INCT-APA	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Pesquisas Ambientais
km	Quilômetro
K _M	Constante de Michaelis-Menten

L	Litro
LABs	Alquilbenzenos Lineares (<i>Linear alkylbenzene</i>)
LDH	Lactato Desidrogenase (<i>Lactate Dehydrogenase</i>)
LPO	Peroxidação de Lipídeos (<i>Lipid Peroxidation</i>)
M	Molar
m	Metro
MCTI	Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação
MDH	Malato Desidrogenase (<i>Malate Dehydrogenase</i>)
mg	Miligrama
min	Minuto
Mit	Fração Mitosólica
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMA	Ministério do Meio Ambiente
mmol	Milimol
na	Não analisado
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo – Forma Oxidada
NADH+H ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo – Forma Reduzida
NADP ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato – Forma Oxidada
NADPH+H ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato – Forma Reduzida
NBT	<i>Nitro-blue tetrazolium</i>
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
ns	Não Significativo
ODH	Octopina Desidrogenase (<i>Octopine Dehydrogenase</i>)
p/v	Peso/Volume
PC	Piruvato Carboxilase
PCBs	Bifenilas Policloradas (<i>Polychlorinated Biphenyl</i>)
PCO	Carbonilação de Proteínas (<i>Protein Carbonylation</i>)
PDHA	Dihidroxiacetona fosfato (<i>Dihydroxyacetone phosphate</i>)
PEP	Fosfoenolpiruvato (<i>Phosphoenolpyruvate</i>)
PEPCK	Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase (<i>Phosphoenolpyruvate Carboxykinase</i>)

PFK	Fosfofrutoquinase (<i>Phosphofructokinase</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PK	Piruvato Quinase (<i>Pyruvate Kinase</i>)
pO ₂	Pressão Parcial de Oxigênio
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
PP	Punta Plaza
PROANTAR	Programa Antártico Brasileiro
psu	Unidade Prática de Salinidade (<i>Practical Salinity Unity</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
S	Salinidade ou Substrato
SECIRM	Secretaria da Comissão Interministerial para Recursos do Mar
SDH	Estrombina Desidrogenase (<i>Strombine Dehydrogenase</i>)
SOD	Superóxido Dismutase
T	Temperatura
TCA	Ciclo do Ácido Cítrico (<i>Tricarboxylic Acid Cycle</i>)
To	Tempo
TPI	Triose-fosfato Isomerase (<i>Triose phosphate Isomerase</i>)
U	Unidade Internacional de Enzimas
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UNITAU	Universidade de Taubaté
UV	Ultra violeta
V	Velocidade
v/v	Volume/Volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. Paleoclimatologia da Antártica e história de ocupação humana	21
1.2. Ação antrópica na Antártica	26
1.3. Zona entremarés: desafios constantes para a manutenção da vida	30
1.4. <i>Nacella concinna</i>	36
1.5. Metais pesados, arginase e <i>Nacella concinna</i>	42
1.6. Metabolismo energético, nitrogenado e defesa antioxidante em <i>N. concinna</i>	44
2. OBJETIVOS.....	50
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1. Coleta de material biológico	51
3.2. Dissecção e obtenção de tecidos	52
3.3. Bioensaios	53
3.3.1. Efeito da condição termo-salina-tempo sobre o metabolismo de <i>N. concinna</i>	53
3.3.2. Efeito do esgoto da EACF sobre o metabolismo de <i>N. concinna</i>	55
3.3.3. Referencial da natureza.....	57
3.4. Obtenção de homogeneizados e frações subcelulares	57
3.4.1. Localização subcelular de arginase.....	57
3.4.2. Distribuição tecidual das arginases e estudos cinéticos.....	58
3.4.3. Bioensaios e referencial da natureza	58
3.5. Procedimentos analíticos	59
3.5.1. Atividade argininolítica	59
3.5.2. Metabolismo energético e nitrogenado.....	60
3.5.3. Enzimas da defesa antioxidante	63
3.5.4. Peroxidação lipídica.....	64
3.5.5. Carbonilação proteica	64
3.5.6. Determinação de proteínas totais.....	65
3.6. Análise de dados.....	65
3.6.1. Cinética enzimática.....	65
3.6.2. Análises estatísticas	65
3.7. Definição de termos e temperaturas	66
3.7.1. Fatores que influenciam a atividade enzimática tecidual	67
3.7.2. Validação de métodos	68
4. RESULTADOS.....	76
4.1. Efeito do aquecimento e da baixa salinidade sobre o metabolismo de <i>Nacella concinna</i> ao longo do tempo	76
4.1.1. Defesa antioxidante	76
4.1.2. Metabolismo energético e nitrogenado.....	80
4.2. Efeito do esgoto da EACF sobre o metabolismo de <i>Nacella concinna</i>	88
4.2.1. Defesa antioxidante	88
4.2.2. Metabolismo energético e nitrogenado.....	92

4.3. Caracterização das arginases de <i>Nacella concinna</i>	99
4.3.1. Localização tecidual e subcelular de arginases em <i>N. concinna</i>	99
4.3.2. Saturação das arginases de <i>N. concinna</i> por L-arginina	100
4.3.3. Efeito de cátions metálicos sobre a atividade argininolítica	101
5. DISCUSSÃO	104
5.1. Efeito de temperatura e salinidade ao longo do tempo	104
5.1.1. Defesa antioxidante.....	104
5.1.2. Metabolismo energético e nitrogenado	110
5.2. Efeito de esgoto.....	119
5.2.1. Defesa antioxidante.....	120
5.2.2. Metabolismo energético e nitrogenado	123
5.3. Caracterização das arginases de <i>Nacella concinna</i>	127
5.3.1. Localização tecidual e subcelular de arginases em <i>N. concinna</i>	127
5.3.2. Saturação das arginases de <i>N. concinna</i> por L-arginina.....	128
5.3.3. Efeito de cátions metálicos sobre a atividade argininolítica	130
6. CONCLUSÕES	137
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139

1. INTRODUÇÃO

Devido ao isolamento físico e condições climáticas extremas, a Antártica é atualmente considerada o último grande deserto intocado pela ação antrópica (BARGAGLI, 2008). O isolamento biogeográfico da Antártica e do Oceano Austral, ocasionado pelo surgimento da Corrente Circumpolar Antártica (ACC), bem como pela presença de bacias oceânicas profundas (BRANDT *et al.*, 2007; GRIFFITHS, 2010), resultou em um grande endemismo de espécies bentônicas marinhas na região, que apresentam uma história evolutiva única (CLARKE *et al.*, 2005), com adaptações extremas à temperatura baixa e estável, bem como aos níveis naturalmente elevados de metais pesados, especialmente na Península Antártica e ilhas adjacentes.

Contudo, nos últimos anos, o aumento expressivo do contingente humano na Antártica têm suscitado diversos questionamentos quanto aos impactos antrópicos sobre a fauna e a flora marinhas. Pouco se conhece sobre as respostas metabólicas de invertebrados antárticos frente aos desafios adaptativos inerentes da região, bem como sobre as respostas desses organismos aos desafios à manutenção da vida impostos pelos impactos antrópicos locais.

1.1. Paleoclimatologia da Antártica e história de ocupação humana

A Antártica atingiu a sua atual posição polar entre 120 a 100 milhões de anos atrás (MICHAUX, 2009). Contudo, estudos com plantas e animais fossilizados mostraram que o clima daquela época era temperado (VERDE *et al.*, 2006; TURNER *et al.*, 2009), onde as temperaturas médias dos meses mais frios superavam os 10 °C, apesar da escuridão do inverno polar (PROSS *et al.*, 2012). A queda gradativa da temperatura global teve início há cerca de 42 milhões de anos e foi acompanhada por ciclos de glaciação, que levaram ao desaparecimento da vegetação na maior parte do continente, e ao desenvolvimento de uma criosfera (SIEGERT & FLORINDO, 2008; PROSS *et al.*, 2012).

As glaciações Antárticas são pouco compreendidas, mas dois eventos que ocorreram durante o Eoceno/Oligoceno, há cerca de 34 milhões de anos, contribuíram para redução expressiva da temperatura na Antártica e promoveram uma das maiores reorganizações climáticas do planeta (CLARKE & JOHNSTON, 1996; DECONTO & POLLARD, 2003).

As aberturas tectônicas das passagens da Tasmânia (Antártica – Austrália) e de Drake (Antártica – América do Sul), separaram fisicamente a Antártica dos demais continentes (KENNETT, 1977) e criaram-se as condições para o surgimento de uma forte corrente oceânica superficial, denominada de Corrente Circumpolar Antártica (ACC; figura 1), que passou a fluir do oeste para o leste, sem qualquer barreira continental (BARRETT, 2003; LAGABRIELLE *et al.*, 2009; TURNER *et al.*, 2009). A redução na troca de calor entre o oceano Austral e as águas quentes da região equatorial, resultou em uma condição climática que resfriou ainda mais a Antártica (KENNETT, 1977; BARRETT, 2003; VERDE *et al.*, 2008).

O segundo evento envolveu redução expressiva do CO₂ atmosférico (40%) antes e durante a glaciação da Antártica. O declínio desse gás na atmosfera reduziu drasticamente o efeito estufa e precipitou as mudanças climáticas, acelerando ainda mais o resfriamento e aumentando a espessura do manto de gelo antártico (DECONTO & POLLARD, 2003; ROYER, 2006; LAGABRIELLE *et al.*, 2009; PAGANI *et al.*, 2011).

A Antártica é cerca de uma vez e meia maior do que o Brasil, apresenta um litoral com 40.000 km de extensão (CLARKE & ARNTZ, 2006; ALLISON *et al.*, 2009), sendo que, no continente, a espessura média da camada de gelo é 2 km e a máxima ultrapassa 4,5 km em alguns pontos. Cerca de 99% da sua superfície permanece permanentemente coberta por gelo, o que ocupa um volume de 25,4 milhões km³, e representa o maior reservatório de água doce do planeta (BARKER *et al.*, 2007; BARGAGLI, 2008). O continente Antártico é considerado o mais frio e seco do planeta, (TURNER, 2015), tendo sido registrada pelo satélite Landsat 8 da NASA, em agosto de 2010, a temperatura de -93,2 °C no Dome Argus. Além de ser a temperatura mais baixa do planeta, ela é cerca de 25 °C mais baixa do que a menor temperatura determinada em regiões permanentemente habitadas pelo homem (NEMIROFF & BONNELL, 2010).

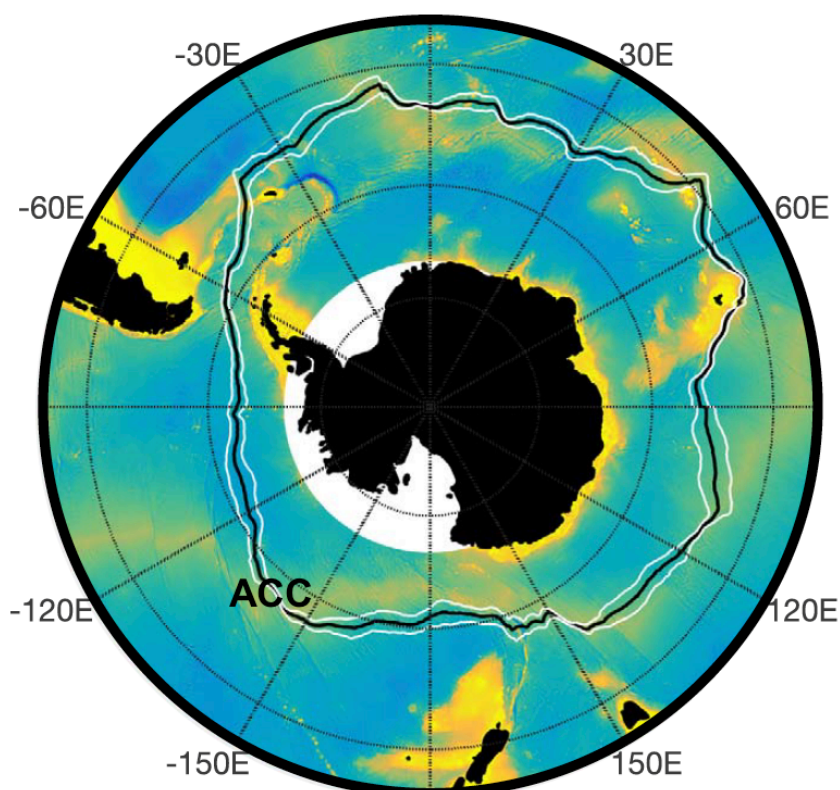


Figura 1. Isolamento físico do oceano austral pela Corrente Circumpolar Antártica (ACC). A linha preta representa a média temporal do posicionamento da ACC no período de 2002 à 2014. Os contornos em branco representam o desvio padrão. Fonte: adaptado de Freeman *et al.* (2016).

O isolamento geográfico e as condições climáticas extremas da Antártica impediram o estabelecimento de uma população humana nativa, bem como levaram ao descobrimento tardio dessa região e, consequentemente, a uma história recente de ocupação humana (CORSOLINI, 2009). Apesar dos primeiros registros históricos de expedições antárticas datarem do século XVI, as atividades humanas na Antártica se intensificaram a partir do século XVIII, tendo esse período sido marcado pela caça de focas e elefantes marinhos em ilhas antárticas e subantárticas, levando algumas espécies ao limiar da extinção. Essas atividades permaneceram até meados do século XX, quando então a caça de baleias, iniciada no século XIX, se tornou a principal atividade comercial, levando algumas espécies quase à extinção. No final do século XIX e início do século XX, enquanto a exploração de recursos naturais permanecia concentrada nas ilhas antárticas e subantárticas, exploradores de diversas nações começaram a desbravar o continente e deram início à “Era Heroica”, marcada pela exploração geográfica e estudos científicos da Antártica (TIN *et al.*, 2014). O contingente humano e as atividades científicas na Antártica aumentaram substancialmente por ocasião do Ano Geofísico Internacional de

1957/58 (IGY). Mais de uma dezena de estações científicas (McMurdo e Amundsen-Scott dos Estados Unidos, Vostok da antiga União Soviética, dentre outras) foram construídas, e cerca de 5.000 pessoas foram deslocadas para região no período de julho de 1957 e dezembro de 1958.

O sucesso da colaboração científica levou à criação do Conselho Científico de Pesquisa Antártica (*Scientific Committee on Antarctic Research*; SCAR), que passou a atuar na sugestão de políticas científicas para região. A cooperação científica também abriu caminho para a assinatura do Tratado da Antártica, em 1º de dezembro de 1959, criando um continente livre de armas nucleares e aberto para ciência. Posteriormente, em 1961, o Tratado foi ratificado pelos 12 membros signatários, em reunião realizada em Washington (WEXLER, 1956; SUMMERHAYES, 2008). Assim, a intensa exploração comercial da Antártica, que perdurou até 1959, sofreu forte restrição, e as atividades humanas ficaram limitadas às instalações científicas e aos navios científicos, de pesca e turismo (COHEN, 2002; TIN *et al.*, 2014).

A despeito das restrições impostas pelo Tratado, a presença humana na região continuou aumentando nos anos subsequentes. A preocupação com a preservação ambiental só começou a ficar evidente na década de 70, quando as partes consultivas do Tratado da Antártica reconheceram a necessidade de proteger essa região da interferência humana. Assim, em 1991, um amplo protocolo de proteção ambiental (Protocolo de Madrid) foi aprovado, recomendando o gerenciamento de resíduos e ressaltando a importância da pesquisa científica direcionada para o monitoramento ambiental. O Protocolo é composto por seis anexos, e estabelece regras para avaliação de impacto ambiental, conservação da fauna e flora, manejo e gerenciamento de lixo e esgoto, prevenção da poluição marinha e manejo de áreas de proteção, como as Áreas Antárticas Especialmente Gerenciadas (ASMAs).

Apesar das recomendações do Protocolo de Proteção Ambiental, nas últimas décadas, a expansão das atividades científicas e do turismo na Antártica, tem suscitado preocupações quanto aos impactos de poluentes sobre os ecossistemas antárticos (LURMAN *et al.*, 2010). A Antártica é considerada a região mais preservada do planeta e uma das últimas fronteiras selvagens. Também é considerada um laboratório natural único para estudos de processos evolutivos que

moldaram a diversidade biológica atual, além de fornecer pistas sobre as inter-relações do genoma com a fisiologia e ecologia, considerando que esse ambiente se encontra no limite das condições físicas capazes de sustentar a vida (CLARKE *et al.*, 2007; FARRENY *et al.*, 2011).

A presença humana é muito evidente na Península Antártica e Ilhas adjacentes devido às condições climáticas mais favoráveis e ao descongelamento da superfície do mar durante o verão austral, o que facilita a navegação. Localizada em menor latitude, essa região apresenta temperaturas de verão frequentemente acima de 0°C, de modo que esta é a única parte da Antártica que experimenta derretimento de gelo substancial durante o verão austral (TURNER *et al.*, 2009).

A Ilha Rei George é a maior do Arquipélago das Shetlands do Sul, com cerca de 80 km na sua extensão máxima (figura 2). Posicionada no extremo norte da Península Antártica, está a cerca de 960 km do Cabo Horn (extremo sul da América do Sul) e 129,5 km da Península Antártica (LIU *et al.*, 2015). O clima da região é tipicamente marítimo, com frequente cobertura de nuvens e alta humidade relativa do ar (KEJNA, 2008). O verão austral, entre novembro e março, é o período mais quente do ano, com temperaturas positivas do ar que variam entre 0 a 10 °C (KEJNA, 1999; SETZER *et al.*, 2004) e média anual, registrada no período entre 1947 e 1995, de -2,8 °C (FERRON *et al.*, 2004).

Dos 1.150 km² da Ilha Rei George, 90% permanece permanentemente coberto por gelo (AGHMICH *et al.*, 2016). Contudo, durante o verão austral, as regiões costeiras ficam livres de gelo. A Área Antártica Especialmente Gerenciada (ASMA#1) da Baía do Almirantado, com 362 km² (BRAUN *et al.*, 2001), inclui a maior Baía da Ilha Rei George e do Arquipélago das Shetlands do Sul (RAKUSA-SUSZCZEWSKI, 1995), e nela se localizam instalações científicas de cinco países, incluindo a Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) do Brasil.

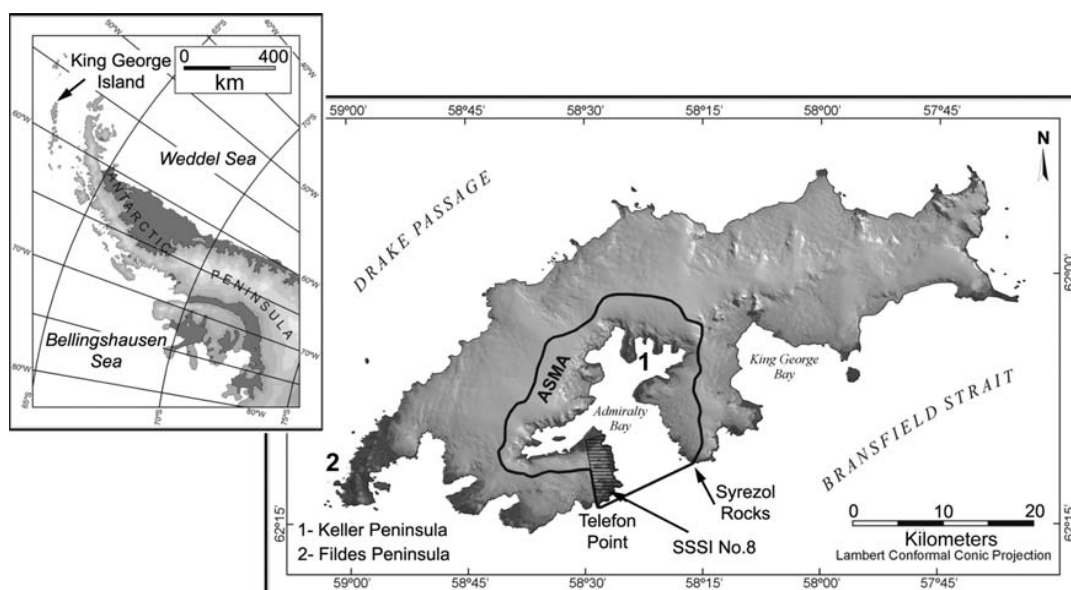


Figura 2. Localização geográfica da Ilha Rei George e da Área Especialmente Gerenciada da Baía do Almirantado (ASMA#1). Fonte: extraído de Arigony-Neto *et al.* (2004).

Por ser visitada constantemente por navios de turismo e pesca, bem como por possuir diversas instalações científicas, que demandam suporte logístico, a Ilha Rei George tem sido alvo de diversos estudos relacionados aos impactos da ação antrópica, em especial no infralitoral raso e zona entremarés.

1.2. Ação antrópica na Antártica

A Antártica é geralmente referida como um local remoto e hostil, bem como símbolo da última grande fronteira selvagem intocada pela perturbação humana. Contudo, assim como outros locais remotos do planeta, a Antártica também está sujeita aos impactos antrópicos local e global (BARGAGLI, 2008). A presença de poluentes orgânicos persistentes (POPs) na biota local (LANA *et al.*, 2014; WOLSCHKE *et al.*, 2015; CINCINELLI *et al.*, 2016; COLABUONO *et al.*, 2016; MONTONE *et al.*, 2016), atmosfera (KHAIRY *et al.*, 2016) e neve (VECCHIATO *et al.*, 2015; KHAIRY *et al.*, 2016) tem sido reportada na Antártica e ilhas adjacentes da Península Antártica. A rota atmosférica tem sido considerada a principal fonte de poluição por POPs (MONTONE *et al.*, 2003).

O impacto antrópico local decorre, primariamente, da presença de navios e instalações científicas. Nos últimos anos, o turismo e o contingente humano das estações científicas aumentaram substancialmente na Antártica e, conseqüentemente, os vazamentos de óleos combustíveis e lançamento de esgoto no ambiente marinho. Somente em 2015/2016, o número de turistas na Baía do

Almirantado foi de cerca de 7.057, a maioria transportados por navios de cruzeiro. Considerando que na temporada de 2005/2006 foram apenas 1.819 turistas em navios, isso representa um aumento de 388% em dez anos (IAATO, 2016).

Além do turismo, as estações científicas demandam suporte logístico, os quais oferecem grande risco ao ecossistema antártico. Devido às condições climáticas mais amenas na região costeira, a maior parte da macrobiota antártica ocupa a região litorânea e, conseqüentemente, está mais exposta aos impactos antrópicos, considerando que aproximadamente 80% das instalações científicas estão localizadas no litoral da Antártica (HUGHES *et al.*, 2013).

No verão austral, entre novembro e março, as temperaturas se tornam mais amenas, os dias são mais longos e a cobertura de gelo sobre o mar sofre uma expressiva redução. Essa condição favorece o aumento da biomassa fitoplanctônica que, direta ou indiretamente, alimenta todos os níveis tróficos superiores da cadeia alimentar. Assim, o verão austral é marcado por uma explosão de vida que coincide com a temporada de reprodução dos organismos (FARRENY *et al.*, 2011). Contudo, também é nesse período que a presença humana aumenta expressivamente na Antártica, já que essa é a alta temporada do turismo e de atividades científicas na região.

A presença humana constante na Antártica tem alterado o ecossistema local, tendo provocado declínio de populações de petrel gigante (MICOL & JOUVENTIN, 2001; CHWEDORZEWSKA & KORCZAK, 2010; PETER *et al.*, 2013) e algumas espécies de pinguins (CHWEDORZEWSKA & KORCZAK, 2010), devido à redução do sucesso reprodutivo em locais onde a presença humana é elevada. Somado a isso, o elevado número de visitantes aumenta o risco de introdução de espécies exóticas na Antártica, as quais podem ser uma ameaça à população nativa, que no geral apresenta uma história evolutiva única. Devido ao clima ameno do verão austral, espécies não nativas de plantas, invertebrados e, principalmente, de microrganismos, têm sido registrados na Península antártica e ilhas subantárticas (FRENOT *et al.*, 2005).

Apesar de a Antártica ser considerada um local intocado, o solo e sedimentos marinhos dos arredores de instalações científicas são geralmente contaminados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e metais pesados, que têm como principais fontes vazamentos de combustíveis, incineração do lixo e

despejo de esgoto (LENIHAN *et al.*, 1990; KENNICUTT II, 1995; BRUNI *et al.*, 1997; HUGHES & THOMPSON, 2004; SANTOS *et al.*, 2005; NEGRI *et al.*, 2006). Devido à ausência de padrão para o manejo de esgoto, até os anos 1980, o esgoto não tratado de estações científicas era descartado diretamente no ambiente marinho raso, na zona entremarés, em gelo marinho ou enterrado em covas de forma descontrolada, enquanto os navios despejavam o esgoto no mar (RUNCIE & RIDDLE, 2004; ARONSON *et al.*, 2011).

No início da década de 90, a comunidade mundial reconheceu a necessidade de preservação da Antártica e, em 1991, os membros signatários do Tratado da Antártica assinaram, na cidade de Madri, um amplo Protocolo de Proteção Ambiental para o Tratado da Antártica, que entrou em vigor em 1998. Contudo, apesar do Protocolo de Proteção Ambiental designar regras para o tratamento e eliminação do esgoto de estações científicas e de navios (COHEN, 2002), atualmente é permitido despejar o esgoto no ambiente marinho antártico em larga escala, possibilitando a inserção de espécies não nativas no ambiente (basicamente microrganismos de origem fecal humana) (ARONSON *et al.*, 2011). Somado a isso, apenas 63% das estações científicas permanentes (que operam ao longo de todo o ano) e 31% das que operam apenas durante o verão, apresentam algum tipo de tratamento de esgoto (GRÖNDAHL *et al.*, 2009).

Contudo, mesmo as estações que possuem algum método de tratamento de esgoto, devido às condições climáticas adversas da Antártica, logística difícil, problemas operacionais, mal-funcionamento do sistema, e sazonalidade populacional, com aumento significativo do número de pessoas durante o verão, muitas vezes o tratamento não é eficiente o bastante para reduzir a liberação de microrganismos no ambiente (GRÖNDAHL *et al.*, 2009; STARK *et al.*, 2015).

A presença de bactérias enteropatogênicas humanas tem sido reportada na fauna antártica, como *Escherichia coli* em filhotes de lobo-marinho antártico (*Arctocephalus gazella*) (HERNANDEZ *et al.*, 2007); três sorotipos de salmonella em pinguins-papua (*Pygoscelis papua*) e lobo-marinho antártico (*A. gazella*) (PALMGREN *et al.*, 2000); e *Campylobacter jejuni* em pinguins-macaroni (*Eudyptes chrysolophus*) (ROMAN *et al.*, 2000).

A perturbação da vida selvagem é geralmente interpretada como uma atividade antrópica tipicamente não-letal, mas que pode causar estresse de curto ou

de longo prazo (COETZEE & CHOWN, 2016). Nesse sentido, o crescente número de humanos na Antártica, um local considerado bastante vulnerável, que apresenta diversos ecossistemas ameaçados e delicados (CLARK *et al.*, 2015), é motivo de grande preocupação.

Os efeitos letais do efluente do esgoto da Base neozelandesa Scott, localizada na Ilha de Ross, foi verificado após a introdução acidental de esgoto nos aquários, resultando na morte de diversos invertebrados (anfípoda *Orchomene plebs*; artrópodes *Colossendeis sp.* e *Ammothea sp.*; equinodermos *Diplasterias brucei* e *Perknaster sp.*; nemertíneo *Parborlasia corrugatus*) e duas espécies de peixes (*Pagothenia borchgrevinki* e *Trematomus bernacchii*) que estavam nos aquários no momento do acidente (MEYER-ROCHOW, 1992).

A exposição de dois invertebrados antárticos, o anfípoda *Paramoera walkeri* e o molusco microgastrópode *Skenella paludionoides*, ao efluente do esgoto da estação australiana Davies, em diluições entre 3 a 68%, elevou expressivamente a taxa de mortalidade desses invertebrados após 14 dias de exposição, indicando que a contaminação por esgoto, embora seja pontual, representa um sério risco para as comunidades marinhas próximas da descarga do efluente (STARK *et al.*, 2015).

O ambiente marinho próximo da estação científica americana McMurdo, localizada na Ilha Ross, encontra-se fortemente contaminado por hidrocarbonetos, metais pesados e bifenilas policloradas (PCBs). Lenihan *et al.* (1990) e Lenihan & Oliver (1995) constataram que a redução da biodiversidade bentônica é mais acentuada em locais próximos da estação, e aumenta gradativamente em função da distância da descarga do esgoto de McMurdo e locais de intensa atividade de navios. Os autores também observaram que o padrão de alteração da comunidade bentônica de locais poluídos é semelhante ao de locais onde ocorre ação abrasiva do gelo marinho. Contudo, a recuperação das áreas perturbadas naturalmente foi muito mais rápida do que as impactadas por poluentes. Resultado semelhante foi observado por Stark e colaboradores (2014), que verificaram redução da biodiversidade da comunidade bentônica nos arredores de locais contaminados pelo despejo de esgoto da estação McMurdo e da estação australiana Casey.

A exposição dos peixes antárticos *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* à diluições de 0,05% (v/v) e 0,5% (v/v) do efluente de esgoto da EACF foi capaz de modular positivamente o metabolismo energético em rins e brânquias desses peixes.

Nesse sentido, *N. rossii* foi capaz de manter a glicemia e elevar os níveis de triacilglicerol plasmático, disponibilizando substratos para atender as demandas energéticas elevadas dos tecidos renal e branquial. Já *N. coriiceps* foi incapaz de manter a glicemia e elevar o triacilglicerol plasmático, sugerindo que essa espécie é mais susceptível aos efeitos deletérios causados pela exposição ao esgoto da EACF (RODRIGUES JR, 2015).

Bioensaios e estudos conduzidos *in situ* com o peixe antártico *Trematomus newnesi* mostraram que o efluente do esgoto da EACF tem potencial genotóxico, e é capaz de elevar a frequência de micronúcleos e induzir anormalidades nucleares eritrocitárias (VAN NGAN *et al.*, 2007).

Estudo de campo com o peixe antártico *Trematomus bernacchii* mostrou que o efluente do esgoto da estação australiana de Davies é capaz de provocar lesões histopatológicas branquiais e hepática. Nesse caso, as alterações mais comuns foram proliferação de células epiteliais, associada com fusão lamelar secundária da brânquias, e granuloma multifocal com inflamação e necrose, além de cistos no fígado. Mesmo em animais coletados a mais de 800 m de distância do foco de contaminação, as alterações foram evidentes. Entretanto, foi observada uma relação inversa entre a proximidade do local de despejo e a severidade das lesões (CORBETT *et al.*, 2014).

Os efluentes de esgoto das estações científicas e navios, normalmente, são constituídos por dejetos humanos, águas cinzas de cozinhas e chuveiros, bem como, em alguns casos, por resíduos químicos dos laboratórios. A composição dos esgotos inclui detergentes, cosméticos, medicamentos, hormônios e uma variedade de outros compostos químicos (CORBETT *et al.*, 2014; STARK *et al.*, 2015). Entender os impactos desses compostos sobre a biota é essencial para o monitoramento ambiental, pois o ecossistema marinho antártico, constituído por uma fauna endêmica é considerado único e o mais vulnerável a esse tipo de poluição (ARONSON *et al.*, 2011; CLARK *et al.*, 2015).

1.3. Zona entremarés: desafios constantes para a manutenção da vida

A zona entremarés (ou faixa litorânea), área localizada entre os extremos de maré alta e baixa, é um ambiente desafiador para a população habitante dessa região, que está constantemente sujeita aos rigores tanto do ambiente marinho

quanto do ambiente terrestre (figura 3). A fim de colonizar e se reproduzir com sucesso em um ambiente novo, os organismos devem ser capazes de apresentar adaptações que permitam sua sobrevivência. Essas adaptações são especialmente cruciais para a sobrevivência de invertebrados marinhos da zona entremarés, um ambiente fisicamente instável, que apresenta situações potencialmente letais para os organismos (CLARK *et al.*, 2008).

Os animais que habitam a zona entremarés na Antártica estão expostos às condições flutuantes dessa região, dominada pelos ciclos das marés, que impõe períodos de emersão e imersão. Apesar da origem e das características marinhas, a fauna e flora colonizadoras da zona entremarés têm que lidar com pressões do ambiente terrestre durante o período de maré baixa. A emersão representa redução de humidade, risco de dessecação (especialmente em dias com sol e vento), alteração do pH e dos níveis de oxigênio nas poças de marés, hipóxia para os que fiquem totalmente emersos e, para os filtradores, restrição alimentar (RAFFAELLI & HAWKINS, 1999c). Somado a isso, a exposição à radiação UV é um outro fator a ser considerado, tendo em vista que, devido à depleção da camada de ozônio, que somente nos últimos anos tem dado sinais iniciais de recuperação (SOLOMON *et al.*, 2016), a incidência de radiação UV é mais intensa na Antártica (ZACHER *et al.*, 2007a; ZACHER *et al.*, 2007b; FRITZ *et al.*, 2008), especialmente no verão austral, quando a incidência de luz é máxima.

Existem registros mostrando que a exposição à radiação UV na Antártica pode levar à redução da abundância e composição da comunidade microbiana marinha (NUNEZ *et al.*, 2006; PAKULSKI *et al.*, 2008); induzir estresse oxidativo (ESTEVEZ *et al.*, 2001), reduzir a capacidade fotossintética (BISCHOF *et al.*, 1998) e impactar negativamente a densidade e diversidade de espécies de algas (ZACHER *et al.*, 2007b); bem como reduzir a taxa de crescimento de fungos terrestres (HUGHES *et al.*, 2003).



Figura 3. As diferentes condições encontradas na zona entremarés na Antártica. Os períodos de maré alta (A) e baixa (B) em Punta Plaza. Temperatura de 7,2 °C medida na concha de um exemplar do gastrópode *Nacella concinna* aderido à rocha na maré baixa (C) e de 8 °C em uma poça de marés contendo exemplares de *N. concinna* (D). Ação das ondas sobre as rochas (E), e o acúmulo de gelo trazido pelas ondas (F) podem deslocar ou causar lesões nos animais aderidos às rochas. A hipossalinidade ocorre devido à formação de rios de degelo que desembocam diretamente na zona entremarés (G). Fonte: a autora (2017).

Outro fator crítico para a colonização da zona entremarés reside na ação das ondas sobre as rochas que é capaz de alterar o padrão de distribuição de comunidades ao longo da costa (PUGH & DAVENPORT, 1997). Apesar do efeito benéfico das ondas, disponibilizando alimentos para os filtradores durante a baixa mar, levando oxigênio e nutrientes para a zona entremarés e diminuindo o risco de dessecação da biota, a intensidade com que as ondas chegam à costa pode causar grande estresse (RAFFAELLI & HAWKINS, 1999c). A perturbação causada pelas ondas pode ser acentuada por cascalhos e pequenas pedras lançadas em direção à zona entremarés, que podem lesar ou deslocar os organismos aderidos às rochas.

O Oceano Austral apresenta um dos mais severos regimes de ondas, impulsionado por ventos predominantemente de oeste ao longo de uma faixa contínua de oceano entre 50-60°S, levando a costa das ilhas antárticas e subantárticas a experimentarem uma elevada energia das ondas, resultando em alterações do padrão de zonação (SMITH & SIMPSON, 2002). Somado a isso, outro fator potencialmente nocivo para os habitantes da zona entremarés dos polos é a ação mecânica do gelo sobre as rochas. Pequenos blocos de gelo marinho são levados para a zona entremarés pela ação das correntes, e ao atingirem a região costeira, são lançados nas rochas litorâneas devido à ação das ondas. Essa ação mecânica do gelo sobre as rochas pode ocasionar lesões potencialmente letais para a biota local.

O período de maré baixa oferece outro desafio adaptativo importante para a biota da zona entremarés antártica. Durante o verão austral, no período de maré alta, a temperatura da água geralmente varia entre -0,5 °C e +1,5 °C (PECK *et al.*, 2006), no entanto, durante a maré baixa, a temperatura nas poças de maré varia de 0 °C a 9 °C (ABELE *et al.*, 1999). Durante o inverno, a amplitude térmica da região litorânea é ainda maior, podendo atingir valores extremamente baixos, como -20 °C, e expondo os habitantes dessa região ao risco de confinamento pelo congelamento da água do mar (PECK *et al.*, 2006).

Durante o verão austral de 2010/2011, Kuklinski e Balazy (2014) constataram que a temperatura da água na zona entremarés da Baía do Almirantado oscilou entre -2,26 e 21,18 °C, sendo que a temperatura da água na zona entremarés apresentou relação direta com a incidência solar e a temperatura do ar. Nesse sentido, em termos de temperatura, os intervalos térmicos experimentados na

zona entremarés estão mais próximos do ambiente terrestre do que do ambiente marinho, particularmente no verão (PECK *et al.*, 2006). Considerando a história evolutiva dos organismos antárticos, adaptados à temperaturas baixas e estáveis, o período de emersão em um dia ensolarado do verão austral pode ser potencialmente letal.

A variação de salinidade é um desafio a mais para os habitantes da zona entremarés, geralmente colonizada por osmoconformistas. Durante o período de imersão, a salinidade ao qual os organismos estão expostos é em torno de 35 psu, que é a salinidade média da água do mar. Entretanto, durante o período de emersão, os organismos da zona entremarés podem enfrentar tanto a hipossalinidade, devido ao aporte das águas de degelo ou nevascas; como a hiperssalinidade, devido à evaporação da água nas poças de maré (PECK *et al.*, 2006).

Durante o verão austral, o gelo acumulado no inverno derrete, e formam-se rios de degelo que desembocam diretamente na zona entremarés, podendo reduzir a salinidade local. Waller e colaboradores (2006a) relataram variação salina entre 17 e 40 psu na zona entremarés na Península Antártica, possivelmente devido à diluição provocada pelas águas de degelo e concentração pela evaporação. Já Davenport (2001) constatou que as poças de marés grandes (3 m de comprimento, 1 m de largura, e 0,2 m de profundidade no centro) apresentam estratificação de salinidade, ou seja, enquanto no fundo da poça a salinidade pode variar entre 7 e 27 psu, na superfície e até 2 cm de profundidade, pode ser 0 psu.

A exposição à hipossalinidade é capaz de alterar respostas fisiológicas, bioquímicas e comportamentais, bem como reduzir a taxa de crescimento de uma variedade de invertebrados marinhos (JANECKI *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2013; BASHEVKIN & PECHENIK, 2015; VELEZ *et al.*, 2016). Nesse sentido, a rápida variação salina, a qual a biota da faixa litorânea está exposta devido ao ciclo das marés, pode levar esses organismos ao estresse osmótico potencialmente letal. Outra consequência é a lixiviação do solo vulcânico da Península Antártica e Ilhas Adjacente pelas águas dos rios de degelo, as quais arrastam metais pesados para a zona entremarés, além de carregar também possíveis contaminantes do solo.

Assim, a biota antártica vive exposta aos níveis naturalmente elevados de metais pesados, presentes no litoral da Península Antártica e ilhas adjacentes

(DIERSSEN *et al.*, 2002; AHN *et al.*, 2004). Por exemplo, os níveis de cobre em sedimentos marinhos da enseada de Collins Harbour da Baía de Maxwell, Ilha Rei George, são considerados semelhantes aos das regiões mais poluídas do planeta (AHN *et al.*, 1996).

Embora as concentrações de metais pesados nas águas superficiais dos mares antárticos sejam relativamente baixas, o nível de cádmio fixado na fração planctônica do Oceano Austral é muito mais elevado do que o encontrado nos demais oceanos do planeta (HONDA *et al.*, 1987). Somado a isso, a queima de combustíveis fósseis, a descarga de esgoto e o uso de tintas têm contribuído para elevação dos níveis de metais pesados nos solos e sedimentos marinhos próximos às estações científicas na Antártica (CLARIDGE *et al.*, 1995; SANTOS *et al.*, 2005).

A bioacumulação de cádmio, na fração fitoplanctônica, e de cobre nos tecidos de moluscos antárticos, tem sido relacionada com os fenômenos de ressurgência e com a lixiviação do solo vulcânico pelas águas de degelo, respectivamente (AHN *et al.*, 1996; AHN *et al.*, 2004). A biodisponibilidade de metais pesados no litoral da Ilha Rei George, é influenciada sazonalmente pelas águas de degelo dos glaciares durante o verão (AHN *et al.*, 2004). O acúmulo de cobre, manganês e chumbo nos tecidos do gastrópode raspador *Nacella concinna*, por exemplo, é maior em sítios sob a influência das águas de degelo dos glaciares do que em outros locais (AHN *et al.*, 2004; CURTOSI *et al.*, 2010).

Além dos fatores físicos, as pressões biológicas também desempenham papel importante para a manutenção da vida na zona entremarés. Acredita-se que a competição por alimento e espaço, bem como o risco de predação, podem ser fatores limitantes que contribuem para o padrão de zonação da zona entremarés (RAFFAELLI & HAWKINS, 1999a). Assim, a colonização da zona entremarés ocorreu sob a pressão seletiva de diversos fatores ambientais, físicos, químicos e biológicos, que limitaram a ocupação dessa região por organismos que dispunham de mecanismos bioquímicos e fisiológicos capazes de sustentar a vida nessas condições. Nesse sentido, poucos invertebrados são capazes de colonizar a zona entremarés da Antártica e sobreviver às variações circadianas e sazonais de temperatura e salinidade, bem como ao atrito mecânico dos blocos de gelo e aos níveis elevados de metais pesados carregados pelas águas de degelo (AHN *et al.*, 2004; WALLER *et al.*, 2006b).

Os animais habitantes da zona entremarés não lidam somente com os desafios naturais, mas também com a ação antrópica. O infralitoral próximo à praia e a zona entremarés da Antártica são particularmente vulneráveis aos contaminantes orgânicos (ANSALDO *et al.*, 2005). Apesar do tratamento primário (para remoção de sólidos) e secundário (para redução de matéria orgânica) do esgoto da EACF, o efluente de esgoto lançado no infralitoral da Baía do Almirantado, na profundidade de 10 m em frente a EACF (MARTINS *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2005; GRÖNDAHL *et al.*, 2009; MONTONE *et al.*, 2010), é responsável pela contaminação local do sedimento marinho por esteroides fecais e alquilbenzenos lineares (LABs) (MARTINS *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2005; MONTONE *et al.*, 2010).

Apesar de ser um ambiente estressante e vulnerável, a zona entremarés apresenta grande importância ecológica. Ainda que apresente diversas pressões físicas e biológicas, a ausência de gelo recobrimdo a zona entremarés durante o verão austral, facilitou a colonização dessa área e o desenvolvimento de uma comunidade abundante, que envolve algas e invertebrados. Dentre os invertebrados, estão presentes diversas espécies de gastrópodes, bivalves, poliquetas, anfípodas, turbellaria, entre outros (BARNES & BROCKINGTON, 2003; WALLER, 2008; SICIŃSKI *et al.*, 2011; BICK & ARLT, 2013; AGHMICH *et al.*, 2016), sendo alguns desses invertebrados sustentados por macroalgas que crescem no substrato rochoso da região costeira e em poças de marés (MARTÍN *et al.*, 2016).

A zona entremarés antártica é ocupada por fauna vágil (GOMES *et al.*, 2013). Devido ao congelamento da água do mar durante o inverno, que pode enclausurar os organismos durante meses, e a falta de luminosidade, que reduz a produção primária, acreditava-se que esses animais residiam, provisoriamente, durante o inverno no infralitoral e migravam para a zona entremarés no verão austral. Entretanto, evidências recentes sugerem que algumas espécies da zona entremarés não migram e permanecem na região ao longo do ano, mas ainda não se sabe como esses organismos sobrevivem congelados e sem luz (WALLER *et al.*, 2006a; WALLER *et al.*, 2006b; BICK & ARLT, 2013).

1.4. *Nacella concinna*

O gastrópode antártico *Nacella concinna* (figura 4) é o macroinvertebrado mais conspícuo da zona entremarés da Península Antártica e ilhas subantárticas (DAVENPORT, 2001). A sua ocorrência no sublitoral chega a profundidade de até

110 metros (CADÉE, 1999), embora as maiores densidades populacionais tenham sido encontradas em profundidades de até 8 metros (BARNES & BROCKINGTON, 2003; BOWDEN, 2005). A bioacumulação de cobre, manganês e chumbo levou alguns autores a proporem *N. concinna* como biomonitor de metais pesados na Antártica (AHN *et al.*, 2004). Adicionalmente, a capacidade acumuladora de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) ficou evidente no naufrágio do quebra-gelo argentino *Bahia Paraíso*, próximo da Ilha Anvers, Península Antártica, quando esse gastrópode foi utilizado como biomonitor de poluição ambiental por óleos combustíveis (KENNICUTT *et al.*, 1991; KENNICUTT II *et al.*, 1992; KENNICUTT II & SWEET, 1992).



Figura 4. Gastrópode *Nacella concinna* aderido às rochas da zona entremarés no período de maré baixa em Punta Plaza, Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Arquipélago das Shetlands do Sul, Antártica. Fonte: a autora (2017).

O gastrópode *N. concinna* da zona entremarés é um importante elo trófico entre produtores primários e predadores de topo da cadeia alimentar antártica (CHOY *et al.*, 2011), servindo de alimento para as aves e sendo o principal item alimentar da gaivota *Larus dominicanus* (FAVERO *et al.*, 1997; FAVERO & SILVA, 1998). Considerando que esse molusco raspador é o mais abundante da região costeira, tendo como alimento algas e o biofilme de microfitobentos de substratos rochosos (BRÊTHES *et al.*, 1994; KIM, 2001), a atividade raspadora de *N. concinna* é capaz de determinar o padrão de colonização e a abundância de micro e macroalgas na zona entremarés (KIM, 2001; CHOY *et al.*, 2011; SEGOVIA-RIVERA & VALDIVIA, 2016).

Apesar do crescimento lento, o patelídeo *N. concinna* é longo vivo, tendo sido reportados espécimes com aproximadamente 60 anos. Entretanto, o tempo médio de vida desse gastrópode foi calculado em 14 anos (BRÊTHES *et al.*, 1994), sendo sua maturidade sexual atingida quando a concha alcança 20 mm de comprimento, o que equivale a idade de 7 anos (PICKEN, 1980; KIM, 2001). A maior concha já documentada, com 61 mm de comprimento, foi encontrada em um monturo de conchas deixadas por gaivotas em Porto Arthur (SHABICA, 1976).

Esse molusco apresenta um único evento de desova anual, que ocorre entre novembro e fevereiro, coincidindo com o período de maior produtividade primária na região e, consequentemente, de microfitobentos (BRÊTHES *et al.*, 1994; STANWELL-SMITH & CLARKE, 1998; KIM, 2001). O estágio de desenvolvimento planctônico é cerca de três vezes mais lento do que o descrito para outros patellogastropoda, sendo necessários 40 a 45 dias para que ocorra o desenvolvimento total da fase planctônica livre-natante, antes do seu estabelecimento no fundo do mar (PECK *et al.*, 2016).

Uma característica marcante desse gastrópode é a existência de dois morfotipos, um que habita permanentemente o sublitoral, e o outro que migra sazonalmente do sublitoral para a zona entremarés no verão austral (BRÊTHES *et al.*, 1994; KIM, 2001). Apesar da capacidade migratória do morfotipo da zona entremarés, alguns espécimes de *N. concinna* foram encontrados sob o gelo da zona entremarés durante o inverno (WALLER *et al.*, 2006b; OBERMÜLLER *et al.*, 2011).

Apesar de ser um ambiente desafiador, acredita-se que *N. concinna* migre para a zona entremarés devido à grande oferta de alimento durante o verão austral, quando o aumento do fotoperíodo favorece o crescimento de algas e microfitobentos na região litorânea. Além disso, a migração oferece a vantagem de reduzir a competição intraespecífica no sublitoral (BRÊTHES *et al.*, 1994; KIM, 2001).

Além da capacidade migratória, os dois morfotipos de *N. concinna* também apresentam diferenças fisiológicas e comportamentais. O morfotipo da zona entremarés é maior (BEAUMONT & WEI, 1991; CHOY *et al.*, 2011), apresenta concha mais alta e resistente, bem como linhas de crescimento mais evidentes do que o morfotipo do sublitoral (BEAUMONT & WEI, 1991; NOLAN, 1991; KIM, 2001). Os espécimes da zona entremarés apresentam circunferência de concha menor do

que os patelídeos do sublitoral, contudo, com volumes de conchas idênticos, o que minimiza a perda de água durante a emersão (WEIHE & ABELE, 2008).

O morfotipo da zona entremarés é mais resistente à dessecação pelo ar do que os espécimes do sublitoral. Isso deve-se à menor circunferência da concha e maior capacidade de adesão ao substrato (WEIHE & ABELE, 2008). Nesse sentido, Weihe & Abele (2008) verificaram que na submersão, o valor de pO_2 da água retida na concha dos animais da zona entremarés é maior do que no interior das conchas dos animais do sublitoral. Possivelmente, isso se deve à maior demanda energética desses animais, os quais são mais ativos do que os espécimes do sublitoral.

Esses dois morfotipos também apresentam respostas diferentes à presença de predadores. O morfotipo do sublitoral percebe a presença da estrela do mar *Lysasterias* sp. a uma distância de 20 cm e empreende fuga. Já o morfotipo da zona entremarés responde somente após contato físico com a estrela do mar. Essa diferença comportamental pode decorrer da coexistência de *N. concinna* do sublitoral com estrelas do mar, onde o risco de predação é elevado, bem como da permanente imersão dos patelídeos do sublitoral, que torna a quimiorrecepção mais factível em relação aos patelídeos da zona entremarés (MARKOWSKA & KIDAWA, 2007).

Os animais da zona entremarés são mais tolerantes à emersão sendo capazes de sustentar o metabolismo aeróbio do pé muscular, diferente do morfotipo do sublitoral, que muda o metabolismo de aeróbio para anaeróbio e não sustenta os níveis musculares de ATP (WEIHE & ABELE, 2008). A maior resistência ao congelamento também é uma característica de *N. concinna* da zona entremarés, com taxa de sobrevivência de 95% após 48h a -6 °C, enquanto os gastrópodes do sublitoral apresentaram uma taxa de sobrevivência de apenas 67% nessa mesma condição (WALLER *et al.*, 2006b).

Como esses dois morfotipos não apresentam distinções gênicas substanciais, as diferenças morfológicas e fisiológicas observadas são, provavelmente, decorrentes da plasticidade fenotípica, induzida pelas pressões ambientais as quais cada morfotipo está exposto (BEAUMONT & WEI, 1991; CHWEDORZEWSKA *et al.*, 2010; HOFFMAN *et al.*, 2010).

No período de maré baixa, o patelídeo *N. concinna* habitante da zona entremarés deve lidar com as pressões ambientais, como risco de dessecação, hipóxia, hipossalinidade devido aos rios de degelo, amplas variações de temperatura, entre outros, e se manter vivo até a maré alta, quando então retorna para condições salina, térmica, de umidade e oxigenação adequadas.

Nesse sentido, alguns estudos foram conduzidos para entender como as adaptações fisiológicas e comportamentais permitem que esse molusco sobreviva em condições ambientais adversas. O aumento da expressão de fator induzido por hipóxia (HIF α) ocorre somente após 12 horas de exposição ao ambiente aéreo, sendo essa resposta tardia e característica de invertebrados aquáticos tolerantes à hipóxia (WEIHE, 2009). Durante a exposição aérea ou sob hipóxia, *N. concinna* é capaz de reduzir a sua taxa metabólica e realizar a captação de oxigênio via pé muscular durante a exposição aérea, sustentando a manutenção de um metabolismo muscular aeróbio (WEIHE & ABELE, 2008; WEIHE *et al.*, 2010).

No seu ambiente natural, *N. concinna* da zona entremarés evita exposição aérea prolongada, procurando se abrigar nas poças de marés, fendas úmidas ou embaixo de rochas, diminuindo o risco de dessecação (WEIHE & ABELE, 2008; SEGOVIA-RIVERA & VALDIVIA, 2016). Somado a isso, a capacidade de adesão ao substrato minimiza substancialmente a perda de água de *N. concinna* durante os períodos de emersão (WEIHE & ABELE, 2008; HELLER, 2015).

Considerando que *N. concinna* é osmoconformista estenoalino e pouco tolerante às baixas salinidades (50% de mortalidade após 96 horas de exposição a 20,9 psu), a entrada de água doce na zona entremarés representa um desafio adaptativo (DAVENPORT, 2001). A redução da salinidade da zona entremarés é muito comum durante o verão austral, quando os rios de degelo dos glaciares desembocam nessa região, expondo *N. concinna* à salinidades que variam entre 0 e 40 psu nas poças de marés (DAVENPORT, 2001; WALLER *et al.*, 2006a).

Para minimizar o impacto hipossalino, *N. concinna* procura o fundo das grandes poças de marés, onde a estratificação da água fica em torno de 27 psu (DAVENPORT, 2001; SEGOVIA-RIVERA & VALDIVIA, 2016). O morfotipo da zona entremarés também se adere firmemente ao substrato rochoso e retrai os tentáculos cefálicos e a cabeça, na tentativa de usar a concha como um “lacre”, isolando as brânquias do ambiente hipossalino ao seu redor. Essa estratégia não é totalmente

efetiva, pois a borda da concha é curva e deixa uma lacuna de acesso para água ao redor. Contudo, essa estratégia é suficientemente eficaz para isolar parcialmente as brânquias e resistir ao impacto hipossalino por alguns minutos. Em superfícies verticais, a estratégia desse gastrópode consiste em soltar-se do substrato para cair no fundo de poças, onde a salinidade da água é maior em relação a superfície. Contudo, o mecanismo adaptativo mais eficaz de tolerância reside na capacidade rápida de recuperação da osmolaridade interna após a exposição hipossalina (DAVENPORT, 2001).

A amplitude térmica é um desafio importante para os ectotérmicos que habitam a zona entremarés, considerando que a temperatura tem efeito direto sobre as velocidades das reações químicas que sustentam os sistemas biológicos (PECK, 2016). A adaptação evolutiva de organismos a ambientes com temperaturas extremas é um problema complexo. A temperatura tem impacto sobre os diversos níveis de organização biológica, se estendendo do molecular e celular até organismos e comunidades (VERDE *et al.*, 2008).

Obermüller e colaboradores (2011) observaram que *N. concinna* é capaz de promover ajustes sazonais e modular a sua temperatura máxima letal. Enquanto no inverno a temperatura máxima letal é 11,8 °C, no verão a temperatura sobe para 12,4 °C. Contudo, Davenport (1997), reportou temperatura máxima letal de verão ainda maior, com valor de 15,6 °C. Em temperaturas acima de 2 °C, a taxa de locomoção desse gastrópode declina e cessa completamente em 14 °C (DAVENPORT, 1997), tornando-os mais vulneráveis, devido à incapacidade de explorar o ambiente em busca de alimento e abrigo.

Na imersão em temperatura de 8 °C, *N. concinna* eleva a concha bem acima do substrato, possivelmente como um mecanismo para aumentar o fluxo de água nas superfícies respiratórias (DAVENPORT, 1997). Pörtner *et al.* (1999b) relataram que até 7 °C, *N. concinna* é capaz de manter o metabolismo aeróbio, sendo que apenas acima de 9 °C o consumo de oxigênio declina. Quando exposto ao aquecimento em 4 °C, esse molusco é capaz de modular positivamente os níveis da enzima superóxido dismutase (SOD) das brânquias e glândula digestiva, potencializando a sua defesa antioxidante (ABELE *et al.*, 1998; FEIJÓ DE OLIVEIRA *et al.*, 2015).

A temperatura mínima letal para *N. concinna* é de -12,9 °C (DAVENPORT, 1997) e a temperatura média de congelamento é de -5,52 °C, bem abaixo de -1,8 °C, que é o ponto de congelamento da água do mar (WALLER *et al.*, 2006b). Para sobreviver ao congelamento, *N. concinna* produz um muco viscoso que, dentre outras coisas, atua como crioprotetor, revestindo o animal e prevenindo a formação e propagação de gelo extracelular, aumentando assim a taxa de sobrevivência após o descongelamento (HARGENS & SHABICA, 1973; HAWES *et al.*, 2010).

Além das pressões naturalmente impostas para a sobrevivência na zona entremarés, a ação antrópica oferece um desafio a mais, considerando a vulnerabilidade da região costeira. Durante o verão austral, quando as condições climáticas são mais amenas, o contingente humano aumenta substancialmente na Antártica, tanto em navios de pesca, turismo e científicos, bem como nas instalações científicas localizadas no litoral. Esse deslocamento humano sazonal ocorre no mesmo período de migração de *N. concinna* para a zona entremarés e de reprodução de organismos antárticos. Assim, a poluição gerada no âmbito das estações científicas litorâneas e navios que operam próximos ao litoral, impactam a zona entremarés com diversos tipos de poluentes, em especial naquilo que diz respeito ao volume de esgoto lançado no mar, que é proporcional ao contingente humano na região (RAFFAELLI & HAWKINS, 1999b; CURTOSI *et al.*, 2009; BUSTAMANTE *et al.*, 2010).

Os vazamentos de óleo diesel na Antártica motivaram alguns estudos que avaliaram o impacto da fração solúvel de hidrocarbonetos do diesel sobre o metabolismo *N. concinna* (ANSALDO *et al.*, 2005; FEIJÓ DE OLIVEIRA, 2013; FEIJÓ DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). Contudo, faltam estudos sobre o impacto do esgoto das estações científicas sobre o metabolismo de *N. concinna*. As estações científicas e navios que operam na região descartam normalmente o esgoto no ambiente marinho, sendo essa uma das principais fontes poluidoras.

1.5. Metais pesados, arginase e *Nacella concinna*

Os processos de bioacumulação e biomagnificação de metais pesados são operativos na cadeia alimentar dos ecossistemas Antárticos, e pelo menos dois bivalves (*Laternula elliptica* e *Adamussium colbecki*) atendem aos critérios preconizados pelo “Mussel Watch” programme para o monitoramento de metais

(AHN *et al.*, 1996; DUQUESNE & RIDDLE, 2002). O acúmulo de cobre, manganês e chumbo nos tecidos de *N. concinna* é maior nas áreas sob a influência da descarga de glaciares do que em outras localidades, mostrando que a disponibilidade e a bioacumulação de alguns metais pesados varia sazonalmente em áreas litorâneas da Antártica (AHN *et al.*, 2004; CURTOSI *et al.*, 2010; TREVIZANI *et al.*, 2016).

Moluscos marinhos são capazes de acumular metais pesados e sobreviver em ambientes poluídos, imobilizando esses metais em grânulos eletrodensos insolúveis e/ou formando complexos solúveis com metalotioneínas (VIARENGO & NOTT, 1993). Esses mecanismos reduzem a concentração intracelular e limitam a disponibilidade de metais pesados para formar ligações com enxofre, nitrogênio e oxigênio de componentes celulares, especialmente proteínas e enzimas, o que poderia levar à disfunções celulares e morte (VIARENGO & NOTT, 1993; SHARMA *et al.*, 2014).

As arginases são enzimas que participam de processos fisiológicos específicos em invertebrados (síntese de poliaminas, controle dos níveis de L-arginina, controle da síntese de óxido nítrico, entre outros), e têm sido pouco estudadas. A remoção da L-arginina formada na decomposição de fosfágenos em músculos de moluscos, ocorre normalmente via síntese de octopina, em reação catalisada pela enzima octopina desidrogenase. Contudo, o pé muscular do gastrópode *Helix pomatia* remove a L-arginina hidroliticamente, via reação catalisada pela arginase (WIESER & PLATZER, 1983). Semelhantemente, o pé muscular de *N. concinna* também não acumula octopina na decomposição da fosfo-L-arginina (PÖRTNER *et al.*, 1999b). Contudo, a via de remoção de L-arginina formada no pé muscular de *N. concinna*, durante a decomposição desse fosfágeno, ainda não está clara.

A distribuição tecidual de arginases varia muito entre moluscos, e níveis elevados dessa enzima têm sido encontrados nas brânquias (CARVAJAL *et al.*, 1984; CARVAJAL *et al.*, 1994a), pé muscular (CARVAJAL *et al.*, 1988) e rim (RODRIGUES *et al.*, 2009). Em tecidos de animais não ureotélicos, os níveis elevados de arginase têm sido associados ao controle dos níveis de L-arginina, que participa como substrato de várias vias metabólicas (JENKINSON *et al.*, 1996).

Por outro lado, as arginases são metaloenzimas que necessitam de um

cátion divalente para atingir a sua atividade plena. O Mn^{2+} é o provável cátion ativador, mas, algumas arginases também são ativadas por Co^{2+} e Ni^{2+} (JENKINSON *et al.*, 1996). Normalmente, o Cu^{2+} atua como um potente inibidor de arginases de vertebrados e invertebrados, inclusive inibindo em 44% a atividade da arginase renal do bivalve antártico *L. elliptica* (RODRIGUES *et al.*, 2009). Já o Cd^{2+} pode substituir o Mn^{2+} em reações catalisadas por arginases de moluscos, mas a sua capacidade ativadora é baixa, o que representa uma grande desvantagem catalítica para a reação (CARVAJAL *et al.*, 1988; CARVAJAL *et al.*, 1994a). Os níveis elevados de cobre e cádmio nas vísceras de *N. concinna* indicam que a via de acesso desses dois metais é basicamente entérica. Contudo, faltam informações robustas sobre a bioacumulação de cobre e cádmio em microfitobentos, que é a provável fonte alimentar de *N. concinna* (AHN *et al.*, 2002; AHN *et al.*, 2004). Nesse sentido, faltam informações sobre a tolerância dos sistemas fisiológicos de *N. concinna* a metais pesados. Não obstante, níveis elevados de cádmio, dissolvido na água do mar, foram capazes de provocar deterioração do epitélio da glândula digestiva de *N. concinna* e comprometer a digestão e absorção de componentes da dieta (NAJLE *et al.*, 2000).

1.6. Metabolismo energético, nitrogenado e defesa antioxidante em *N. concinna*

Apesar dos estudos mostrando os limites de tolerância ao aquecimento (PÖRTNER *et al.*, 1999b; PECK *et al.*, 2014), exposição ao ar (WEIHE & ABELE, 2008), metais pesados (AHN *et al.*, 2004; WEIHE *et al.*, 2010) e hipossalinidade (DAVENPORT, 2001), ainda pouco se conhece sobre as respostas metabólicas de *N. concinna* frente às condições termo-salinas flutuantes da zona entremarés. Também, até onde temos conhecimento, não existem estudos mostrando o impacto do esgoto de estações científicas sobre o metabolismo de *N. concinna*. Outrossim, os mecanismos de defesa de *N. concinna* contra a ação deletéria de metais pesados, os quais permitem que esse gastrópode ocupe nichos ricos em cádmio e cobre, também ainda não foram devidamente estudados. Apesar da tolerância de gastrópodes terrestres a níveis teciduais elevados de cobre e cádmio ter sido atribuído a metalotioneínas (DALLINGER *et al.*, 1997), até o presente momento, apenas metalotioneínas específicas para cádmio foram encontradas no intestino de *N. concinna* (LEE *et al.*, 2006).

A glândula digestiva foi analisada considerando ser esse o tecido com maior potencial de bioacumulação de metais (AHN *et al.*, 2002). A brânquia foi escolhida considerando que, ao efetuar trocas gasosas, está em contato direto com os contaminantes presentes na água. O pé muscular foi analisado considerando a alta demanda metabólica desse tecido no cumprimento do seu papel na locomoção, adesão ao substrato e captação de oxigênio durante a exposição aérea (WEIHE *et al.*, 2010), e também por estar em contato direto com a água e os possíveis contaminantes.

Os mecanismos geradores de ATP são a base de todos os sistemas fisiológicos e são essenciais para a manutenção de funções vitais, tais como digestão, locomoção, reprodução, crescimento, obtenção de alimento, entre outros. As vias oxidativas de glicose, lipídeos e proteínas são as principais responsáveis pelo suprimento energético dos tecidos de animais (HOCHACHKA & SOMERO, 2002). O metabolismo energético de *N. concinna* é baseado em proteínas, sendo que a excreção do nitrogênio ocorre primariamente na forma de amônia (62,6 à 90,7%) e secundariamente na forma de ureia (3,3 à 24,5%) (SUDA *et al.*, 2015). O aquecimento é capaz de elevar o consumo de oxigênio de *N. concinna*, mas em temperaturas acima de 9 °C, o metabolismo aeróbio aparentemente perde a sua eficiência, e é substituído, pelo menos em parte, pelo metabolismo anaeróbio, que promove o acúmulo dos ácidos orgânicos acético, succínico e propiônico nos tecidos desse gastrópode (MORLEY *et al.*, 2009a).

Assim, os níveis das seguintes enzimas foram determinados como marcadores do metabolismo energético/nitrogenado dos tecidos de *N. concinna* (figura 5): a) hexoquinase (HK), marcadora do potencial ativador de glicose, introduzindo a glicose no metabolismo intermediário; b) fosfofrutoquinase (PFK) e piruvato quinase (PK), que juntamente com a HK, atuam como enzimas reguladoras do potencial glicolítico dos tecidos (TREBERG *et al.*, 2007; MULUKUTLA *et al.*, 2014); c) lactado desidrogenase (LDH), octopina desidrogenase (ODH), estrombina desidrogenase (SDH), alanopina desidrogenase (ADH), piruvato carboxilase (PC) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), marcadoras do potencial anaeróbio gerador de ATP (HOCHACHKA & SOMERO, 2002); d) citrato sintase (CS), isocitrato desidrogenase (IDH) e malato desidrogenase (MDH), marcadoras do potencial aeróbio gerador de ATP (RODRIGUES *et al.*, 2012; RODRIGUES JR. *et al.*, 2015);

e) alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), glutamato desidrogenase (GDH) e arginase (ARG), marcadoras do potencial excretório nitrogenado, disponibilizando cadeias carbônicas de aminoácidos para o metabolismo energético (PUPPO & BLASCO, 1995; HOCHACHKA & SOMERO, 2002).

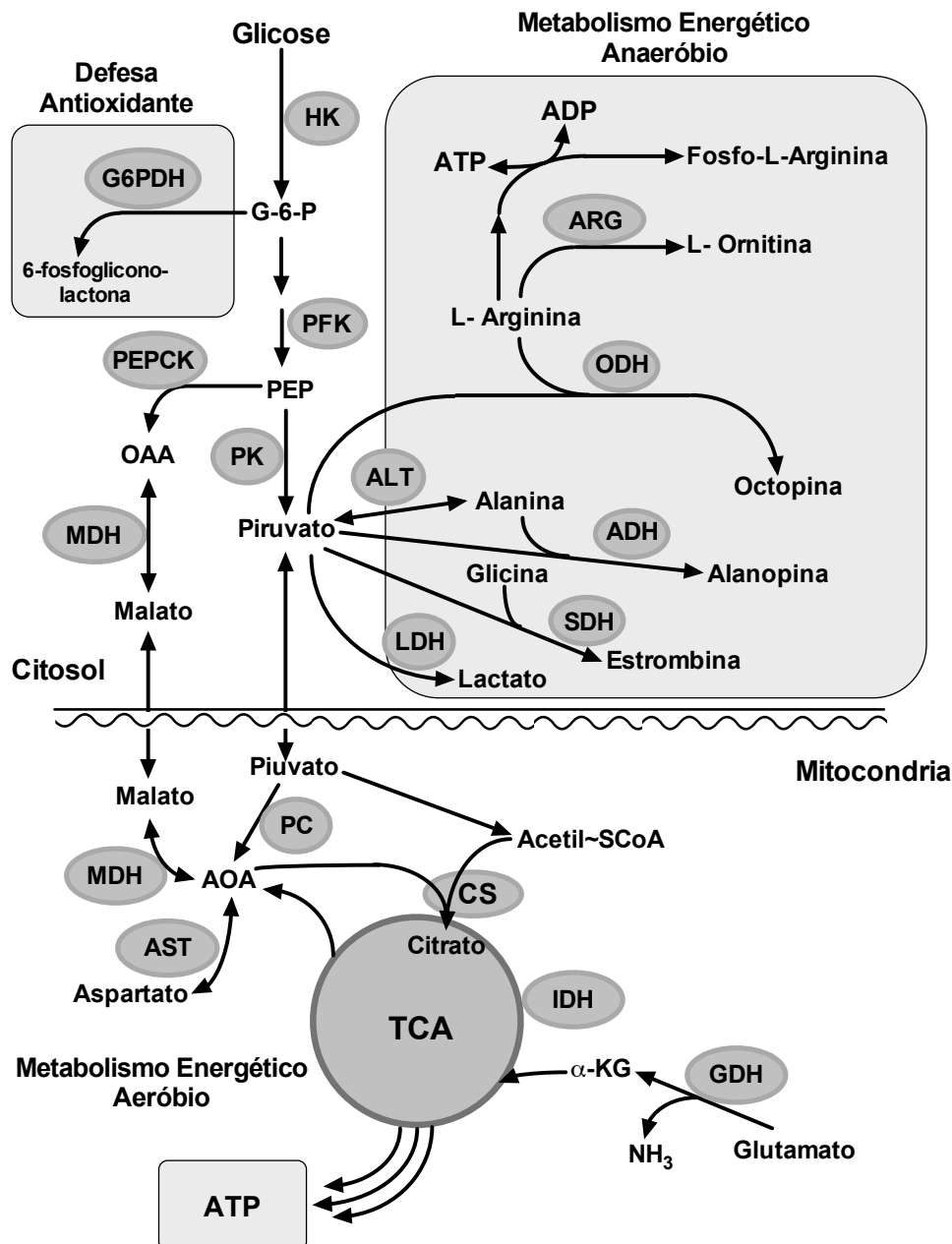


Figura 5. Enzimas utilizadas como marcadores do metabolismo energético e nitrogenado. Foram determinados os níveis das enzimas hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK), piruvato quinase (PK), piruvato carboxilase (PC), fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), citrato sintase (CS), isocitrato desidrogenase (IDH), malato desidrogenase (MDH), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), alanopina desidrogenase (ADH), estrombina desidrogenase (SDH), octopina desidrogenase (ODH), arginase (ARG) e glutamato desidrogenase (GDH) do metabolismo energético e nitrogenado, bem como glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) da via das pentoses e defesa antioxidante. TCA: ciclo do ácido cítrico; α -KG: α -cetoglutarato; AOA: oxaloacetato. Fonte: a autora (2017).

A defesa antioxidante tem papel fundamental na neutralização de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem lesar oxidativamente o DNA, lipídeos e proteínas, sendo portanto potencialmente letais. Condições estressantes, como o aquecimento, a presença de poluentes e de metais pesados, são capazes de acelerar a formação de ROS e modular os níveis de enzimas da defesa antioxidante de brânquias, pé muscular e da glândula digestiva de *N. concinna* (WEIHE *et al.*, 2010; FEIJÓ DE OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Assim, os níveis das seguintes enzimas foram determinados como marcadores do potencial antioxidante dos tecidos de *N. concinna* (figura 6): a) glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), como marcadora do potencial redutor celular na forma de $\text{NADPH} + \text{H}^+$; b) glutathiona redutase (GR), que mantém os níveis de glutathiona reduzida; c) superóxido dismutase (SOD), que dismuta o radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2); d) catalase (CAT), que evita a cisão homolítica de H_2O_2 , decompondo-o em $\text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$; e) glutathiona S-transferase (GST), que conjuga glutathiona à endo e xenobióticos, evitando a formação de ROS (CIRCU & AW, 2010).

Considerando que o radical hidroxil (OH^\bullet) é o mais potente dentre as espécies reativas de oxigênio (SHI *et al.*, 2005), e que os mecanismos de bioacumulação de metais pesados operam de forma mais intensa na glândula digestiva de *N. concinna*, o que pode resultar na formação de OH^\bullet pela reação de Fenton (ABELE & PUNTARULO, 2004), foram determinados os níveis de lipídeos peroxidados (LPO) e proteínas carboniladas (PCO), como marcadores de lesão oxidativa na glândula digestiva.

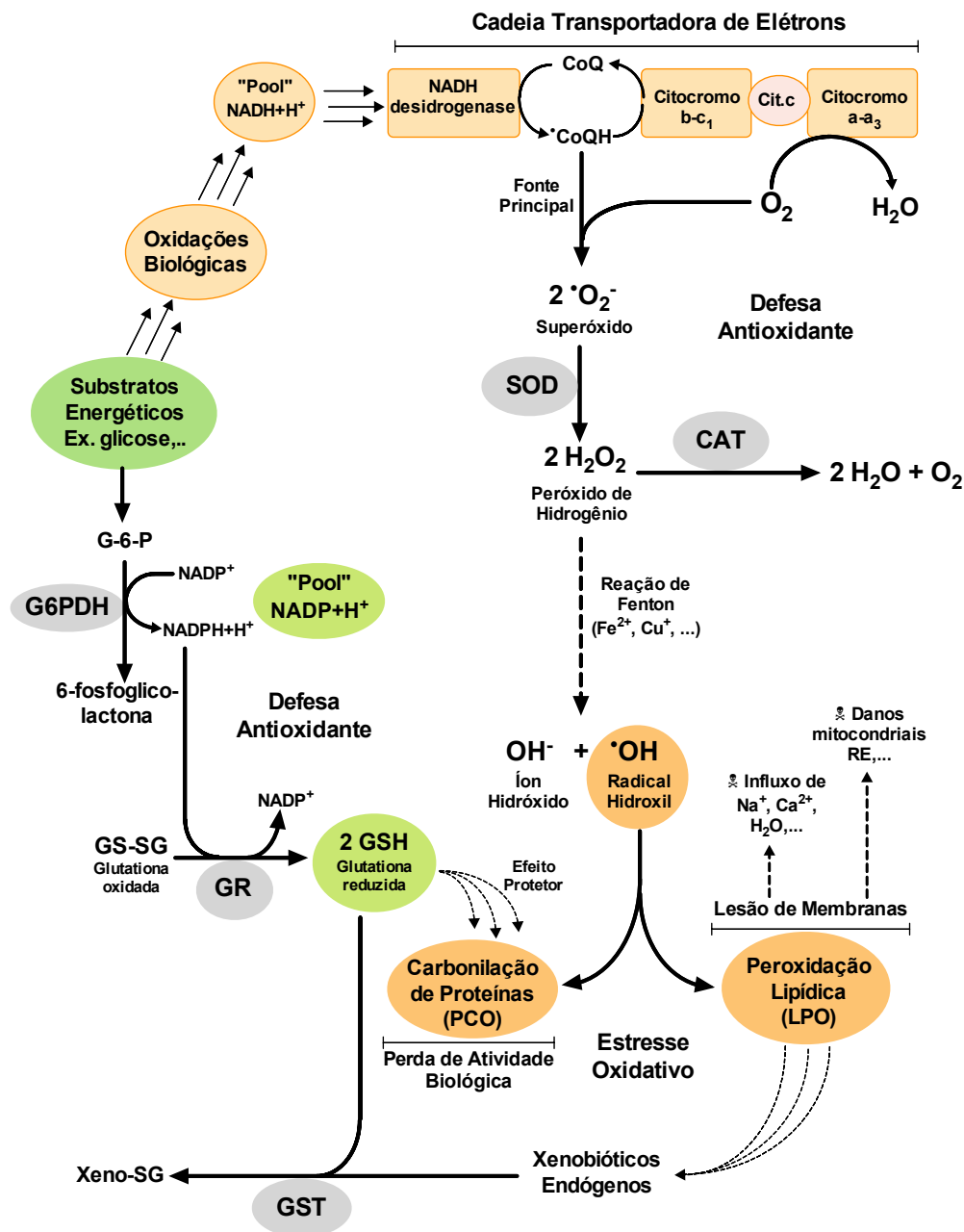


Figura 6. Enzimas utilizadas como marcadores da defesa antioxidante e marcadores não enzimáticos de lesão oxidativa. Os níveis das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona redutase (GR), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e glutaciona S-transferase (GST) foram utilizados como marcadores da defesa antioxidante. Os níveis de peroxidação lipídica (LPO) e proteínas carboniladas (PCO) foram utilizados como marcadores de lesão oxidativa. CoQ: Coenzima Q; Cit C: citocromo C; RE: retículo endoplasmático; GSSG: glutaciona oxidada; GSH: glutaciona reduzida. Fonte: a autora (2017).

As arginases são metaloenzimas amplamente distribuídas na natureza que necessitam de um cátion divalente para sua atividade plena. No fígado de animais ureotélicos, essa enzima catalisa a reação terminal do ciclo da ureia, e em tecidos extra-hepáticos de ureotélicos e nos tecidos de animais não ureotélicos, controla os níveis do aminoácido L-arginina (JENKINSON *et al.*, 1996). Dessa forma, na

presente tese, foram conduzidos estudos para verificar a distribuição tecidual e subcelular de arginase em *N. concinna*, bem como caracterizar cineticamente as arginase branquial e do pé muscular desse molusco, com o intuito de avaliar a extensão da participação dessa enzima sobre o controle dos níveis de L-arginina. Adicionalmente, para avaliar a tolerância de *N. concinna* na ocupação de nichos naturalmente ricos em metais pesados, em especial cobre, e a sua possível relação com arginases mais resistentes à inibição por cátions metálicos, foram realizados estudos sobre o efeito de metais na atividade argininolítica de brânquias e pé muscular de *N. concinna*.

2. OBJETIVOS

O presente estudo objetivou avaliar os efeitos de fatores naturais e antrópicos sobre o metabolismo energético, nitrogenado e defesa antioxidante das brânquias, pé muscular e glândula digestiva de *Nacella concinna*. Especificamente, tivemos como objetivo:

- ✓ Determinar o grau do impacto do aquecimento e redução da salinidade, ao longo do curso do tempo, bem como as possíveis interações entre aquecimento, hipossalinidade e tempo, sobre os níveis de enzimas do metabolismo energético/nitrogenado e da defesa antioxidante das brânquias, pé muscular e glândula digestiva, bem como as lesões oxidativas sobre proteínas e lipídeos da glândula digestiva;
- ✓ Determinar quais os efeitos do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) sobre os níveis de enzimas do metabolismo energético/nitrogenado e da defesa antioxidante das brânquias, pé muscular e glândula digestiva, bem como as eventuais lesões oxidativas sobre proteínas e lipídeos da glândula digestiva;
- ✓ Verificar a distribuição tecidual e subcelular da arginase de *N. concinna*, as propriedades cinéticas dessa enzima e o efeito de cátions metálicos sobre a atividade argininolítica.

Dessa forma, foram levantadas as seguintes hipóteses sobre os possíveis impactos de fatores naturais e antrópicos sobre o metabolismo de *N. concinna*: a) o aquecimento e a hipossalinidade, impostas pelos ciclos de marés, são capazes de modular, no curto prazo, os níveis de enzimas do metabolismo energético e nitrogenado, bem como enzimas da defesa antioxidante; b) o efluente do esgoto da EACF, descartado no litoral da Baía do Almirantado, é capaz de modular a defesa antioxidante e causar lesões oxidativas na glândula digestiva desse gastrópode, bem como modular o metabolismo energético e nitrogenado das brânquias e pé muscular; c) as arginases desse gastrópode devem ser resistentes aos níveis naturalmente elevados de metais pesados, e apresentar níveis e propriedades cinéticas compatíveis com o controle dos níveis de L-arginina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de material biológico

O presente estudo foi conduzido com espécimes de *Nacella concinna* medindo entre 30 e 40 mm de comprimento da concha. Os animais foram removidos manualmente de substratos rochosos da zona entremarés de Punta Plaza (PP; 62°05'28,6''S/58°24'21''W) durante a baixa mar, e transportados em caixas plásticas, com água do mar, até os laboratórios da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF; 62°05'S/58°24'28''W), localizada na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica, Antártica (figura 7). A escolha de PP como sítio de coleta considerou a elevada densidade/quantidade de patelídeos na região e a baixa incidência de poluentes derivados do esgoto da EACF (MONTONE *et al.*, 2010).

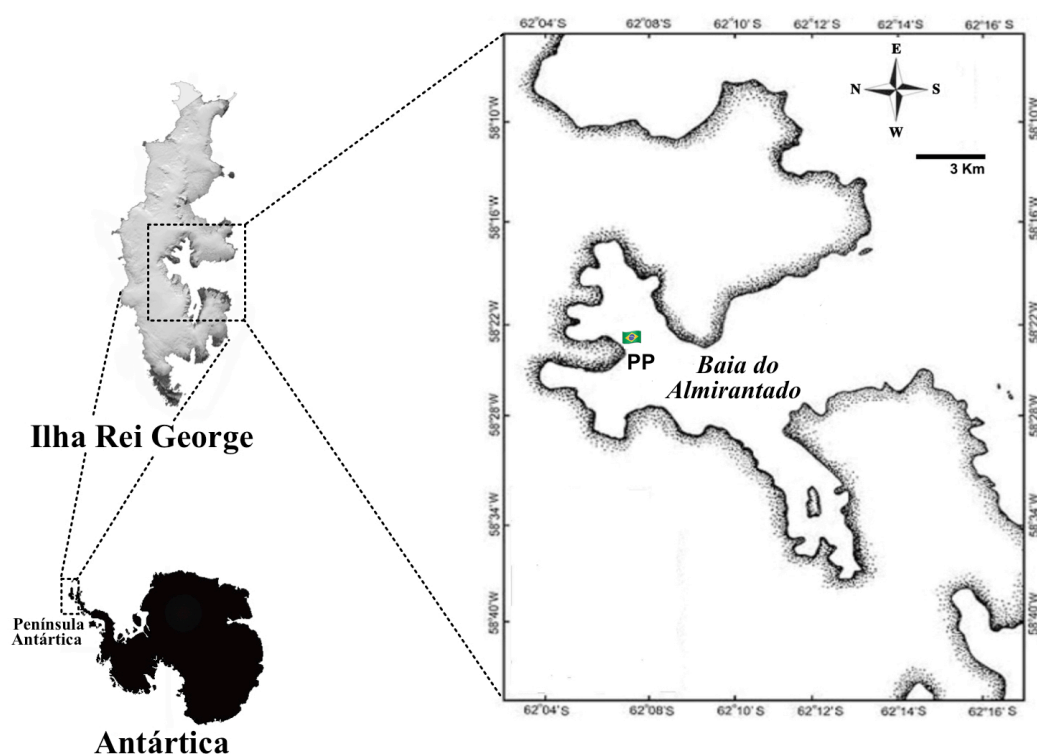


Figura 7. Localização geográfica de Punta Plaza (PP). Os espécimes de *Nacella concinna* foram coletados em PP, próximo da estação Comandante Ferraz (bandeira brasileira), na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica, Antártica. Fonte: adaptado de Rodrigues Jr. *et al.* (2013).

A localização tecidual/subcelular da arginase e os estudos sobre o efeito de cátions metálicos na atividade da arginase branquial e do pé muscular foram conduzidos com exemplares de *N. concinna* coletados no período de janeiro à março de 2011. Os bioensaios com efluente do esgoto da EACF foram conduzidos com espécimes coletados durante o verão austral de 2011/2012. Já os animais

utilizados nos experimentos de temperatura-salinidade-tempo foram coletados durante o verão austral de 2013/2014.

A licença ambiental foi emitida pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) e os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob o nº 496/2010 e 840B/2015.

3.2. Dissecção e obtenção de tecidos

Os animais foram dissecados sob refrigeração, em temperatura entre 0 °C e 4 °C, preservando ao máximo a atividade biológica dos tecidos. As brânquias foram cuidadosamente dissecadas, separando as lamelas branquiais da estrutura da borda do manto, onde estão localizados os órgãos sensoriais desse gastrópode (figura 8). A glândula digestiva e o pé muscular foram obtidos após a remoção do gastrópode da concha. O conjunto de tecidos moles foi rapidamente submerso em nitrogênio líquido, para elevar a consistência dos tecidos e facilitar o procedimento cirúrgico de retirada da glândula digestiva.

Os espécimes de *N. concinna* utilizados nos estudos de localização tecidual/subcelular, bem como nos estudos com cátions metálicos sobre a atividade arginilolítica, foram mantidos por 5 dias em água do mar a 0 °C e 35 psu, com aeração constante até o momento da dissecção. Não foi oferecida alimentação e o fotoperíodo foi de 12 h luz e 12 h escuro.

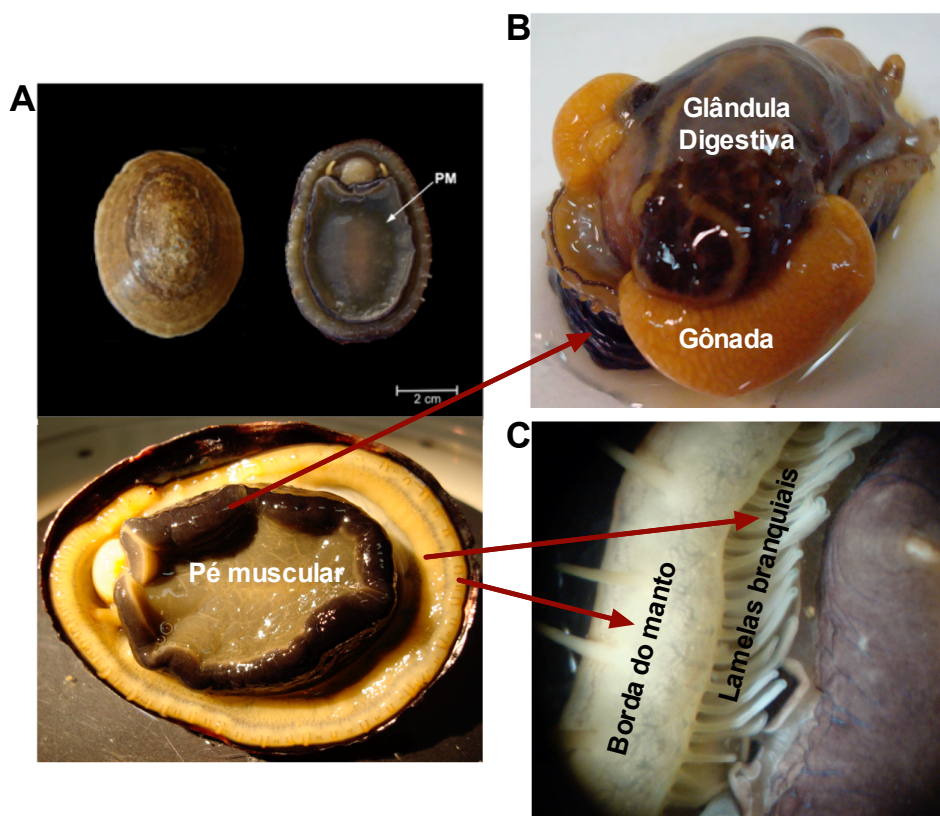


Figura 8. Detalhes anatômicos de *Nacella concinna*. Vista dorsal da concha e ventral do pé muscular (A). Vista dorsal do conjunto de tecidos moles removidos da concha, mostrando a localização anatômica do pé muscular (PM), glândula digestiva e gônada (B). Imagem amplificada da localização anatômica da borda do manto e lamelas branquiais (C). Fonte: a autora (2017).

3.3. Bioensaios

3.3.1. Efeito da condição termo-salina-tempo sobre o metabolismo de *N. concinna*

O efeito do aquecimento e da hipossalinidade sobre o metabolismo energético, nitrogenado e a defesa antioxidante de *N. concinna* foram avaliados no curso do tempo de 3, 6, 12, 24 e 48h, nas condições termo-salinas de 0 °C e 35 psu; 4 °C e 35 psu; 0 °C e 25 psu; 4 °C e 25 psu. Os experimentos foram conduzidos em aquários plásticos de 225 x 146 x 119 mm (comprimento x largura x altura), com 2,5 L de água do mar. A temperatura foi controlada por banho-maria ultratermostático (figura 9). A salinidade de 25 psu foi obtida diluindo a água do mar com água de degelo, semelhante ao que ocorre na zona entremarés de locais próximos das descargas de glaciares.

Os bioensaios foram conduzidos com 180 patelídeos distribuídos aleatoriamente em 12 aquários. Após aclimação por 3 dias na condição termo-

salina de 0 °C e 35 psu, 8 patelídeos (um por aquário) foram removidos, dissecados e brânquias, glândula digestiva e pé muscular imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Esse conjunto de animais foi assumido como tempo zero dos experimentos.

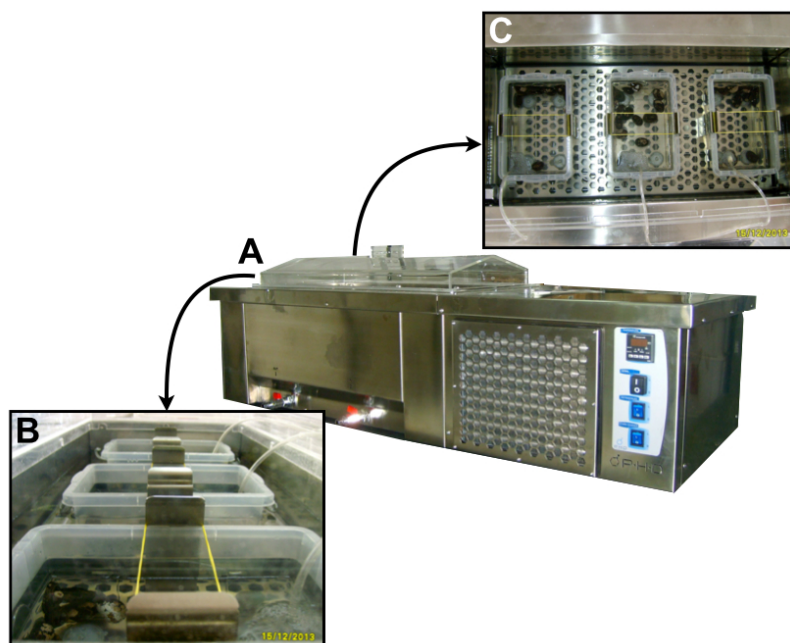


Figura 9. Banho-maria ultratermostático com circulação interna de água. Vista frontal (A). Os aquários (caixas plásticas) foram fixados por presilhas e elásticos nos banhos ultratermostáticos (B). Os experimentos com *Nacella concinna* foram conduzidos com 3 aquários por banho (C), com aeração constante e nas temperaturas de 0 °C e 4 °C. Fonte: a autora (2017).

A condição termo-salina de 0 °C - 35 psu foi mantida em 3 dos 12 aquários e assumida como controle experimental. Os demais aquários, em grupos de três, tiveram a sua condição termo-salina alterada, como mostrado na figura 10. O início dessa nova fase experimental foi marcado pelo esgotamento dos aquários mediante sifonamento. A transição da condição 0 °C - 35 psu para as demais condições termo-salinas foi gradativa e ocorreu ao longo de 2 h. A água foi trocada diariamente mediante sifonamento dos aquários, seguida da imediata recomposição da água previamente ajustada na condição termo-salina experimental. Não foi oferecida alimentação para os animais no decorrer de todo o bioensaio, o fotoperíodo foi de 12 h escuro e 12 h luz. A aeração dos aquários foi mantida constante ao longo do experimento.

No curso dos tempos de 3h, 6h, 12h, 24h e 48 h, foram retirados, aleatoriamente, 8 patelídeos de cada condição termo-salina, dissecados e os tecidos congelados imediatamente em nitrogênio líquido. Considerando que cada condição

termo-salina contemplava 3 aquários, o primeiro animal foi retirado do aquário 1, o segundo do aquário 2, e assim sucessivamente até totalizar 8 animais por condição termo-salina/tempo. Brânquias, glândula digestiva e pé muscular foram separados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e, posteriormente, transportados e armazenados nessa mesma condição criogênica. Assim, apenas 168 animais dos 180 foram dissecados, sendo que os 12 restantes foram devolvidos no mesmo ponto de coleta. Todas as análises bioquímicas foram realizadas no laboratório de bioquímica da Universidade de Taubaté.

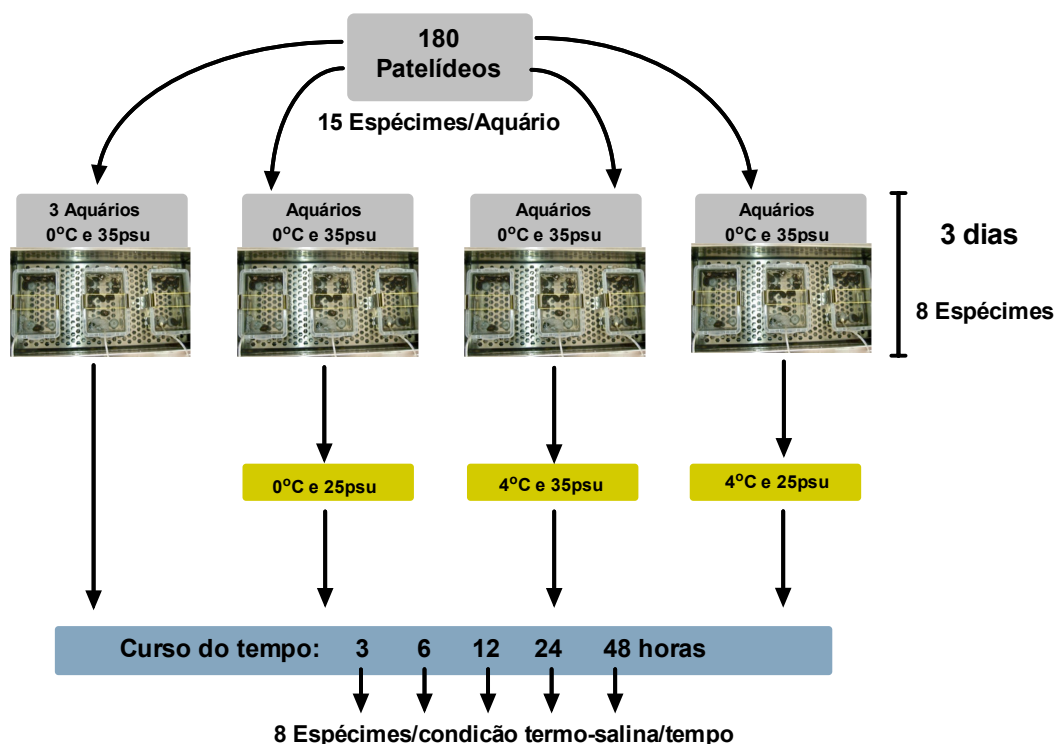


Figura 10. Esquema do modelo experimental dos bioensaios termo-salinos. Os experimentos foram conduzidos com espécimes de *Nacella concinna*, distribuídos igualmente em 12 aquários, os quais foram alocados em banhos-maria ultratermostáticos para o controle da temperatura. Todos os patelídeos dos 12 aquários foram aclimatados inicialmente na condição termo-salina de 0 °C - 35 psu por três dias. Em seguida, três conjuntos de aquários foram mantidos na condição controle de 0 °C - 35 psu, sendo que os demais, em grupos de três aquários, tiveram a condição termo-salina permutada para 0 °C - 25 psu, 4 °C - 35 psu e 4 °C - 25 psu. No curso dos tempos de 3, 6, 12, 24 e 48 h, foram retirados 8 patelídeos de cada uma das condições termo-salinas. Fonte: a autora (2017).

3.3.2. Efeito do esgoto da EACF sobre o metabolismo de *N. concinna*

Os bioensaios referentes ao efeito do esgoto da estação de tratamento de esgoto (ETE) sobre o metabolismo energético, nitrogenado e defesa antioxidante de *N. concinna* foram conduzidos com 30 patelídeos, uniformemente distribuídos em três aquários de 225 x 146 x 119 mm (comprimento x largura x altura), contendo 2,5

L de água do mar, na condição termo-salina 0 °C - 35 psu, a qual é uma condição próxima do infralitoral da Ilha Rei George. A temperatura dos experimentos foi controlada por banho-maria ultratermostático, como mostrado na figura 11.

Após três dias de aclimação, os aquários foram sifonados até o esvaziamento total e adicionado o mesmo volume água do mar nas seguintes condições: a) água do mar na condição termo-salina 0 °C, 35 psu, sem adição de efluente de esgoto, no aquário controle; b) água do mar contendo efluente do esgoto da EACF, diluído para 0,05% (v/v) e 0,5% (v/v), nos aquários experimentais. O efluente da ETE foi coletado do interior da tubulação de esgoto, em segmento próximo da sua descarga no infralitoral. Esse procedimento foi autorizado pela Secretaria da Comissão Interministerial para Recursos do Mar (SECIRM).

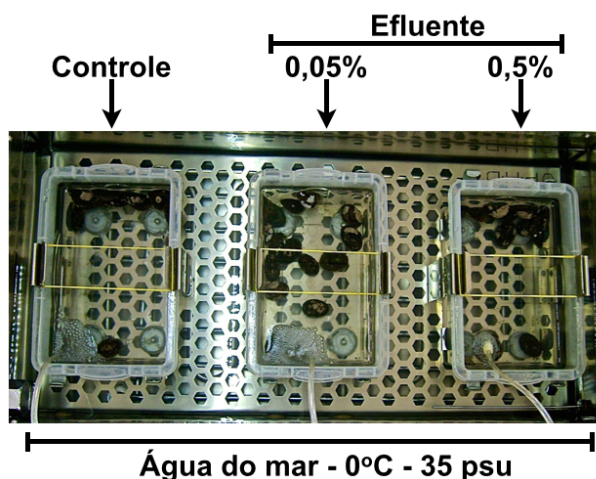


Figura 11. Desenho experimental dos ensaios com o efluente de esgoto da estação Comandante Ferraz. Os experimentos com *Nacella concinna* foram conduzidos em aquários, na condição controle sem adição de esgoto e com o esgoto diluído à 0,05% (v/v) e 0,5% (v/v) em água do mar. As condições termo-salina foram mantidas constantes ao longo dos experimentos. Fonte: a autora (2017).

A água do mar dos aquários foi trocada diariamente, mediante esgotamento dos aquários por sifonamento e reposição do mesmo volume na mesma condição experimental. Os animais não foram alimentados ao longo dos experimentos e o fotoperíodo foi de 12 h escuro e 12 h luz. A aeração dos aquários foi mantida constante durante o período experimental.

Os patelídeos foram mantidos sob experimentação por nove dias e, no décimo dia, foram dissecados. Brânquias, pé muscular e glândula digestiva foram separados e congelados em nitrogênio líquido para armazenamento e transporte. Todas as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da Universidade de Taubaté (UNITAU).

3.3.3. Referencial da natureza

O metabolismo de *N. concinna* em condição natural foi utilizado como referencial da natureza. Para tanto, oito espécimes foram coletados e transportados em água do mar até os laboratórios da EACF. Os animais foram rapidamente dissecados e brânquias, pé muscular e glândula digestiva foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido. O procedimento como um todo (coleta, transporte, dissecação e congelamento das amostras) foi conduzido em tempo inferior à 3 h. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, bem como transportadas e armazenadas na mesma condição criogênica.

3.4. Obtenção de homogeneizados e frações subcelulares

Todas as etapas preparativas dos homogeneizados utilizados no presente estudo, para determinar os níveis de enzimas, estudar o comportamento cinético das arginase e obter frações subcelulares, foram conduzidas em temperaturas entre 0 °C e 4 °C.

3.4.1. Localização subcelular de arginases

Após a coleta dos animais, pé muscular e brânquias provenientes de 10 patelídeos foram dissecados e imediatamente homogeneizados em Potter-Elvehjen utilizando tampão Hepes 20 mM (pH 7,4), contendo K₂HPO₄ 5 mM, trimetilamina N-óxido 1 mM e sacarose 250 mM, na proporção peso/volume (g/mL) de 1:5 e 1:10, respectivamente.

Os extratos livres de células foram centrifugados a 2.500 g por 10 minutos, os sedimentos descartados e sobrenadantes centrifugados a 12.000 g por 10 minutos. Os sobrenadantes dessa etapas foram utilizados para quantificar a atividade argininolítica total e proteínas totais da fração citosólica.

Os sedimentos foram ressuspensos em 1 mL de tampão Hepes acima descrito, centrifugado à 12.000 g por 10 minutos, e os sobrenadantes foram descartados. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes. Após a última centrifugação o sedimento mitocondrial foi ressuspenso em 500 µL de tampão de Hepes acima descrito, sonicado por 30 segundos para ruptura mitocondrial e centrifugado por 10 minutos a 12.000 g (CASEY & ANDERSON, 1982). O sobrenadante dessa etapa foi utilizado para determinar a atividade argininolítica total e proteínas totais da fração mitossólica.

Todas as etapas preparativas dos homogeneizados e frações subcelulares, bem como as medidas da atividade argininolítica, foram realizadas nos laboratórios da EACF. As proteínas totais foram determinadas no laboratório de bioquímica da UNITAU.

3.4.2. Distribuição tecidual das arginases e estudos cinéticos

Pé muscular, brânquias e *pool* dos demais tecidos moles de 5 espécimes de *N. concinna* foram dissecados e imediatamente homogeneizados em Potter-Elvehjen com tampão Hepes 20 mM (pH 7,4) contendo K_2HPO_4 5 mM, trimetilamina N-óxido 1 mM e sacarose 250 mM, na proporção peso/volume (g/mL) de 1:5, 1:10 e 1:10, respectivamente. Os homogeneizados foram sonicados por 30 segundos e centrifugados por 10 minutos à 12.000 g.

Os sobrenadantes foram utilizados para: a) determinar os níveis de arginases presentes nos tecidos de *N. concinna*; b) estudar o efeito da concentração do substrato L-arginina sobre a atividade das arginase de brânquias e pé muscular; c) avaliar o efeito de cátions metálicos sobre a atividade das arginase de brânquias e pé muscular. Todas as etapas preparativas de homogeneizados e estudos cinéticos foram conduzidos nos laboratórios da EACF.

3.4.3. Bioensaios e referencial da natureza

Brânquias, pé muscular e glândula digestiva de patelídeos dos bioensaios, e daqueles utilizados como referencial da natureza, foram homogeneizados em Potter-Elvehjen com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) na proporção peso/volume (g/mL) de 1:10, 1:5 e 1:5, respectivamente. Os homogeneizados foram sonicados durante 30 segundos para romper estruturas subcelulares, especialmente mitocôndrias, e centrifugados a 12.000 g por 10 minutos.

Os homogeneizados de glândula digestiva, utilizados para análise de proteínas carboniladas, foram preparados em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), contendo EDTA 1 mM na proporção peso/volume (g/mL) de 1:5. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos. As amostras não foram sonicadas para reduzir a liberação de ácidos nucleicos e os sobrenadantes foram tratados com sulfato de estreptomicina, para eliminar a interferência de ácidos nucleicos sobre o método analítico, como descrito por Reznick & Packer (1994), com modificações. Alíquotas dos sobrenadantes foram

acrescidas de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,2), contendo sulfato de estreptomicina 10% (p/v), para uma concentração final de sulfato de estreptomicina 1% (p/v). Após 15 minutos em temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada à 11.000 g por 15 minutos, e os sobrenadantes livres de ácidos nucleicos foram utilizados para determinação de proteínas carboniladas.

3.5. Procedimentos analíticos

Todas as determinações bioquímicas foram realizadas em triplicata, e os métodos validados utilizando tecidos de *N. concinna*. As atividades enzimáticas e os níveis de proteínas totais, proteínas carboniladas e peroxidação lipídica foram determinados espectrofotometricamente no leitor de microplacas FLUOstar OPTIMA da BMG Labtech. Apenas a atividade da catalase foi determinada no espectrofotômetro Beckman DU-640, utilizando cubetas de quartzo de 500 µL e caminho óptico de 1 cm.

3.5.1. Atividade arginínolítica

A atividade da arginase (ARG) foi determinada por método descontínuo. Os níveis teciduais e subcelulares dessa enzima foram determinados em tampão glicina 20 mM (pH 9,5), contendo L-arginina 100 mM (pH 9,5) e MnCl_2 1 mM, na temperatura de 0 °C.

As curvas de saturação da ARG por L-arginina, foram estabelecidas em tampão Hepes 20 mM (pH 7,4), contendo MnCl_2 1 mM e concentrações de L-arginina entre 0 e 200 mM (pH 7,4), na temperatura de 0 °C.

Os estudos com cátions metálicos foram conduzidos em tampão Hepes 20 mM (pH 7,4), contendo L-arginina 30 mM (pH 7,4) e cátion(s) metálico(s) na concentração de 1 mM (HgCl_2 , $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, CoCl_2 , $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, NiCl_2 , CdCl_2 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, FeCl_3 , MnCl_2). A atividade arginínolítica obtida sem a adição de cátion(s) divalente(s) ao sistema de reação, foi assumida como controle. A atividade arginínolítica foi determinada à 0 °C.

Alíquotas de sobrenadantes de brânquias (10 µL) e pé muscular (40 µL) foram adicionadas ao sistema de reação para um volume final de 250 µL. A reação foi interrompida pela adição de 250 µL de HCl 0,75 M e centrifugado a 10.000 g por 5 minutos. Os sobrenadantes contendo a L-ornitina formada na reação catalisada

pela ARG, foram aliquotados em tubos criogênicos, congelados em nitrogênio líquido e transportados para o laboratório de bioquímica da UNITAU.

A L-ornitina foi determinada pelo método de Chinard (1952) com modificações. Alíquotas dos sobrenadantes foram transferidas para microplacas de 96 poços, contendo solução de ninidrina 6% (p/v) em 2-metoxietanol. As placas foram seladas com *SealPlate*® e, após 60 minutos à 85 °C, alíquotas de 70 µL foram transferidas para microplacas de 384 poços e as absorbâncias lidas em $\lambda=520$ nm.

Uma Unidade Internacional (U) de ARG foi definida como a quantidade de enzima que converteu 1 µmol de L-arginina em L-ornitina no tempo de 1 minuto. Os níveis de ARG das frações subcelulares de brânquias e pé muscular, foram relativizadas em função da concentração de proteínas e expressas em U/mg proteína. Os níveis de ARG dos estudos com cátions metálicos foram relativizadas em função do controle e as atividades expressas em porcentagem (%).

3.5.2. Metabolismo energético e nitrogenado

Os níveis de enzimas do metabolismo energético e nitrogenado de *N. concinna* foram determinadas à 20 °C, utilizando os seguintes sistemas de reação:

- ✓ Hexoquinase (HK) foi determinada em tampão imidazol 50 mM (pH 7,4), contendo glicose 2 mM, ATP 2 mM, MgCl₂ 10 mM, NADP⁺ 0,4 mM, ditioneitol (DTT) 0,5 mM, KCl 2 mM e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) 0,3 U/mL. A reação teve início pela adição de amostra. O aumento de absorbância foi monitorado em $\lambda=340$ nm (BALDWIN *et al.*, 2007);
- ✓ Fosfofrutoquinase (PFK) foi determinada em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,2), contendo ATP 1 mM, MgCl₂ 10 mM, NADH+H⁺ 150 µM, AMP 2 mM, KCl 250 mM, glicerolfosfato desidrogenase 1 U/mL, aldolase 1,2 U/mL, triose fosfato isomerase 10 U/mL. A reação teve início pela adição de frutose-6-fosfato para a concentração final de 5,0 mM. A redução de absorbância foi acompanhada em $\lambda=340$ nm (BALDWIN *et al.*, 2007);
- ✓ Piruvato quinase (PK) foi determinada em tampão imidazol 50 mM (pH 7,4), contendo ADP 5 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 25 mM, NADH+H⁺ 150 µM e lactato desidrogenase 9 U/mL. A reação teve início pela adição de fosfoenolpiruvato (PEP) para a concentração final de 5 mM. A redução de absorbância foi acompanhada em $\lambda=340$ nm (LEVESQUE *et al.*, 2002);

- ✓ Lactato desidrogenase (LDH) foi determinada em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), contendo piruvato de sódio 1 mM, KCl 100 mM e NADH+H⁺ 250 µM. A reação teve início pela adição de amostra. A redução de absorbância foi acompanhada em $\lambda=340$ nm (THUESEN *et al.*, 2005);
- ✓ Octopina desidrogenase (ODH) foi determinada em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0), contendo piruvato de sódio 1 mM e NADH+H⁺ 300 µM. A reação teve início pela adição de L-arginina (pH 7,0) para a concentração final de 2 mM. O consumo endógeno de NADH+H⁺ foi determinado em sistema de reação sem L-arginina. A redução de absorbância foi acompanhada em $\lambda=340$ nm (CARVAJAL *et al.*, 1994b);
- ✓ Alanopina desidrogenase (ADH) foi determinada em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), contendo piruvato de sódio 1 mM e NADH+H⁺ 300 µM. A reação teve início pela adição de L-alanina para a concentração final de 10 mM. O consumo endógeno de NADH+H⁺ foi determinado em sistema de reação sem L-alanina. A redução de absorbância foi acompanhada em $\lambda=340$ nm (CARVAJAL *et al.*, 1994b);
- ✓ Estrombina desidrogenase (SDH) foi determinada em tampão imidazol 100 mM (pH 7,0), contendo piruvato de sódio 2,5 mM e NADH+H⁺ 300 µM. A reação teve início pela adição de glicina para a concentração final de 120 mM. O consumo endógeno de NADH+H⁺ foi determinado em sistema de reação sem glicina. A redução de absorbância foi acompanhada em $\lambda=340$ nm (NICCHITTA & ELLINGTON, 1984);
- ✓ Piruvato carboxilase (PC) foi determinada em tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), contendo MgSO₄ 5mM, NaHCO₃ 15 mM, ATP 1mM, acetil-coenzima A 0,1 mM, KCl 15 mM, NADH+H⁺ 150 µM e malato desidrogenase 10 U/mL. A reação teve início pela adição de piruvato de sódio para a concentração final de 5 mM. O consumo endógeno de NADH+H⁺ foi determinado em sistema de reação sem piruvato. A redução de absorbância foi acompanhada em $\lambda=340$ nm (WARREN & TIPTON, 1974);
- ✓ Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) foi determinada em tampão imidazol 50 mM (pH 7,0), contendo MgSO₄ 2 mM, MnCl₂ 2 mM, NaHCO₃ 20 mM, DTT 1 mM, PEP 2 mM, NADH+H⁺ 150 µM, malato desidrogenase 6 U/mL. A reação teve início pela adição de IDP para a concentração final de 0,5 mM. O consumo endógeno de NADH+H⁺ foi determinado em sistema de

reação sem IDP. A redução de absorbância foi acompanhada em $\lambda=340$ nm (PAYNTER *et al.*, 1985; WIESE *et al.*, 1991);

- ✓ Alanina aminotransferase (ALT) foi determinada em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), contendo α -cetoglutarato (α -KG) 10 mM, $\text{NADH}+\text{H}^+$ 150 μM , lactato desidrogenase 5 U/mL. A reação teve início pela adição de L-alanina para concentração final de 20 mM. O consumo endógeno de $\text{NADH}+\text{H}^+$ foi determinado em sistema de reação sem L-alanina. A redução de absorbância foi acompanhada em $\lambda=340$ nm (PAYNTER *et al.*, 1985);
- ✓ Aspartato aminotransferase (AST) foi determinada em tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), contendo α -KG 10 mM, $\text{NADH}+\text{H}^+$ 150 μM , malato desidrogenase 5 U/mL. A reação teve início pela adição de L-aspartato para a concentração final de 20 mM. O consumo endógeno de $\text{NADH}+\text{H}^+$ foi determinado em sistema de reação sem L-aspartato. A redução de absorbância foi acompanhada em $\lambda=340$ nm (PAYNTER *et al.*, 1985);
- ✓ Citrato sintase (CS) foi determinada em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), contendo KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTNB (dissolvido em Tris-HCl 50 mM pH 7,4) 0,2 mM e acetil-coenzima A 0,2 mM. A reação teve início pela adição de oxaloacetato para a concentração final de 0,5 mM. O aumento de absorbância foi acompanhado em $\lambda=410$ nm (SABOROWSKI & BUCHHOLZ, 2002);
- ✓ Isocitrato desidrogenase (IDH) foi determinada em tampão Tris-HCl 70 mM (pH 7,4), contendo MgSO_4 8 mM, NADP^+ 500 μM , MnCl_2 1 mM. A reação teve início pela adição de solução contendo D/L-isocitrato e citrato para a concentração final de 3 mM e 20 mM respectivamente. O aumento de absorbância foi acompanhado em $\lambda=340$ nm (PÖRTNER *et al.*, 1999a);
- ✓ Malato desidrogenase (MDH) foi determinada em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), contendo oxaloacetato 0,4 mM, MgCl_2 20 mM e $\text{NADH}+\text{H}^+$ 150 μM . A reação teve início pela adição de amostra. A redução de absorbância foi acompanhada em $\lambda=340$ nm (CHILDRESS & SOMERO, 1979);
- ✓ A atividade da arginase (ARG) foi medida como descrito por Chinard (1952) com modificações, em microplacas de 96 poços. A atividade argininolítica foi determinada em tampão glicina 50 mM (pH 9,5), contendo L-arginina 100 mM (pH 9,5) e MnCl_2 1 mM. A reação foi interrompida pela adição de HCl 0,2813

M, para uma concentração final de 0,0625 M. Em seguida, foi adicionado ninidrina 6% (p/v), dissolvida em 2-metoxietanol. As placas foram seladas com *SealPlate*®, e após 60 minutos em 85 °C, alíquotas de 70 µL foram transferidas para placas de 384 poços, e as absorbâncias determinadas em $\lambda=520$ nm;

- ✓ Glutamato desidrogenase (GDH) foi determinada em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), contendo sulfato de amônio 100 mM e NADH+H⁺ 100 µM. A reação teve início pela adição de α -KG para a concentração final de 5 mM. A redução de absorbância foi acompanhada em $\lambda=340$ nm (CIARDIELLO *et al.*, 2000).

3.5.3. Enzimas da defesa antioxidante

Os níveis de enzimas da defesa antioxidante de *N. concinna* foram determinadas à 20 °C, utilizando os seguintes sistemas de reação:

- ✓ Glutathione redutase (GR) foi determinada em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), contendo EDTA 0,5 mM e NADPH+H⁺ 250 µM. A reação teve início pela adição de glutathione oxidada (GSSG) para a concentração final de 1 mM. A redução de absorbância foi acompanhada em $\lambda=340$ nm (LUSHCHAK & BAGNYUKOVA, 2006);
- ✓ Superóxido dismutase (SOD) foi determinada em tampão carbonato de sódio 100 mM (pH 10,2), contendo EDTA 17,5 µM e cloreto de nitro azul tetrazólio (NBT) 1 mM. A reação teve início pela adição de hidroxilamina para concentração final de 3,7 mM. O aumento de absorbância foi acompanhado em $\lambda=560$ nm (KONO, 1978);
- ✓ Catalase (CAT) foi determinada em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0), contendo H₂O₂ 12 mM. A reação teve início pela adição da amostra. A redução de absorbância foi acompanhado em $\lambda=240$ nm (REGOLI *et al.*, 1997);
- ✓ Glutathione S-transferase (GST) foi determinada em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,5), contendo glutathione reduzida (GSH) 1 mM. A reação teve início pela adição de 1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), dissolvido em etanol, para a concentração final de 1,5 mM. As medidas de absorbância da reação espontânea entre CDNB e GSH foi subtraída das leituras de atividade

das amostras. O aumento da absorbância foi acompanhado em $\lambda=340$ nm (REGOLI *et al.*, 1997);

- ✓ Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) foi determinada em tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,4), contendo glicose-6-fosfato 1,0 mM e NADP⁺ 200 μ M. A reação foi iniciada pela adição de amostra (brânquia e pé muscular) ou glicose-6-fosfato (glândula digestiva). O aumento da absorbância foi acompanhado em $\lambda=340$ nm (CIARDIELLO *et al.*, 1995).

As atividades das enzimas do metabolismo energético, metabolismo nitrogenado e da defesa antioxidante foram expressas em Unidade Internacional (U), definida como a quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 μ mol de substrato em produto no tempo de 1 minuto, ou mU (nmol/min). Exceção feita à SOD, que teve a atividade expressa em função da sua habilidade de inibir a redução do NBT, como descrito por Kono (1978). Assim, 1 unidade de SOD (U SOD) foi definida como a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a redução de NBT do sistema de reação. As atividades enzimáticas foram normalizadas em função da concentração de proteínas totais e expressas em U/mg de proteína ou mU/mg de proteína, inclusive SOD.

3.5.4. Peroxidação lipídica

Os níveis de peroxidação lipídica (LPO) foram determinados pelo método FOX e utilizados como marcadores de lesão oxidativa. Alíquotas de homogeneizados de glândulas digestivas foram incubadas em sistema de reação contendo metanol 95,75%, Xilenol Laranja 100 μ M, H₂SO₄ 25 mM, hidroxitolueno butilado (BHT; dissolvido em metanol) 4 mM e FeSO₄.NH₄ 250 μ M. As leituras de absorbância foram realizadas em $\lambda=560$ nm (JIANG *et al.*, 1991; JIANG *et al.*, 1992). Os resultados foram normalizados em função da concentração proteica total das amostras e expressos em nmol/mg proteína.

3.5.5. Carbonilação proteica

Os níveis de proteínas carboniladas (PCO) foram determinados pelo método descrito por Levine *et al.* (1990) e Quinlan & Gutteridge (2000) e utilizados como marcadores de lesão oxidativa. Amostras livres de ácidos nucleicos foram incubadas, protegidas da luz, à 37 °C durante 90 minutos com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH; dissolvido em HCl 2 M) 10 mM. Os brancos foram

preparados com amostras incubadas com HCl 2 M, em substituição ao DNPH. Na sequência, foi adicionado ácido tricloroacético 28% (p/v) e os tubos centrifugados a 4.000 g por 3 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos lavados três vezes com etanol – acetato de etilo 1:1 (v/v), seguido de centrifugação a 4.000 g por 6 minutos, para cada ciclo de lavagem. Os sedimentos foram ressuspensos em hidrocloreto de guanidina 6 M (dissolvido em tampão fosfato de potássio 20 mM pH 2,3) e os tubos centrifugados a 4.000 g por 3 minutos. Alíquotas dos sobrenadantes dessa etapa foram transferidas para microplacas de 96 poços, e lidas em $\lambda=340$ nm. O nível de proteínas carboniladas foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar das hidrazonas ($2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os resultados foram normalizados em função da concentração proteica total e expressos em nmol/mg proteína.

3.5.6. Determinação de proteínas totais

A concentração proteica das amostras foi determinada pelo método BCA (*bicinchoninic acid*), similar ao método de Lowry, utilizando o Kit QuantiPro BCA da Sigma, e soro albumina bovina como padrão. As leituras espectrométricas foram realizadas em $\lambda=560$ nm.

3.6. Análises de dados

3.6.1. Cinética enzimática

As curvas de saturação da arginase por L-arginina foram ajustadas mediante regressão linear, para enzimas hiperbólicas com um ou dois sítios catalíticos (ou duas isoenzimas). Os gráficos e os cálculos cinéticos foram realizados no programa GraphPad Prism 5,0. A presença de formas isoenzimáticas foi caracterizada por gráficos de Michaelis e Eadie-Scatchard (SEGEL, 1993). As atividades argininolíticas na presença de cátions metálicos foram normalizadas em relação ao controle, o qual foi assumido como 100%.

3.6.2. Análises estatísticas

As comparações estatísticas foram conduzidas no programa “Statistica” e, dependendo do conjunto de dados, foram conduzidas análises de variância de três vias (*three-way*) para avaliar os efeitos termo-salino-tempo, e de uma via (*one-way*) para avaliar o efeito de metais e do esgoto, seguido de pós-teste de Tukey. A normalidade e a homogeneidade dos dados foram acessadas usando os testes de

Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Sempre que necessário, os dados foram logaritmo transformados, para atender as exigências ANOVA. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Para melhor visualizar os efeitos do aquecimento e baixa salinidade ao longo do tempo e das interações entre fatores, os dados foram agrupados considerando os resultados do teste ANOVA trifatorial. Assim, para evidenciar o efeito da temperatura, os resultados foram agrupados em 0 ou 4 °C, independentemente do tempo ou condição salina; para demonstrar o efeito da salinidade, o agrupamento foi conduzido em 35 ou 25 psu, sem considerar a temperatura ou tempo; para observar o efeito do tempo, os dados foram agrupados em 3, 6, 12, 24 e 48 horas, independentemente da condição termo-salina. Já para visualizar as interações entre fatores, os dados foram agrupados de acordo com os fatores participantes da interação, sem considerar o outro fator. Por exemplo, para verificar a interação temperatura-salinidade, os resultados foram agrupados de acordo com a condição termo-salina, sem considerar o tempo.

3.7. Definição de termos e temperaturas

As atividades enzimáticas dos tecidos de *N. concinna* foram determinadas com o objetivo de entender: a) como fatores naturais e antrópicos poderiam estar aumentando ou diminuindo a concentração tecidual de enzimas; b) como cátions de metais pesados e o substrato L-arginina podem modular a atividade das arginases em condições térmicas e de pH próximas das fisiológicas.

No primeiro caso, a concentração tecidual de enzimas foi determinada considerando que a atividade enzimática específica varia diretamente em função a concentração enzimática sob condições otimizadas. Semelhante a diversos bioquímicos e fisiologistas (HOCHACHKA & SOMERO, 2002; SOMERO, 2004), nós utilizamos o termo “níveis enzimáticos” ou “níveis de enzimas” como sinônimo de “atividade enzimática específica” ou “concentração enzimática”. Assim, diferentes concentrações enzimáticas teciduais do gastrópode *N. concinna* aclimatado em condições experimentais distintas, não representam ativação ou inibição enzimática, mas sim aumento ou redução da concentração da enzima.

Já no segundo caso, as medidas de atividade argininolítica não representam “níveis”, pois trata-se do efeito direto de cátions de metais pesados e do substrato L-

arginina sobre a atividade da arginase, ou seja, a concentração da enzima foi mantida constante ao longo das análises, e o aumento ou redução da atividade argininolítica não tem relação com o nível enzimático. É importante diferenciar as medidas de atividade quanto às suas finalidades, distinguindo as medidas de atividade que indicam a concentração enzimática em homogeneizados teciduais, daquelas que refletem a ação direta de substratos, inibidores e ativadores sobre a atividade enzimática.

3.7.1. Fatores que influenciam a atividade enzimática tecidual

Alterações ambientais envolvendo temperatura, pH, salinidade e poluentes podem promover desastroso desequilíbrio metabólico, comprometer a integridade de sistemas fisiológicos, e inviabilizar a vida de organismos. Direta ou indiretamente as enzimas são responsáveis pela manutenção dos ritmos metabólicos e, conseqüentemente, dos sistemas fisiológicos. A atividade enzimática tecidual pode ser controlada quantitativamente pela expressão gênica, e qualitativamente pela modulação da atividade de enzimas pré-existentes, via concentração de substrato, ativadores e/ou inibidores (CLARKE, 2003). Frequentemente, bioquímicos e fisiologistas utilizam a atividade enzimática como marcador do metabolismo, como forma de entender as estratégias metabólicas operacionalizadas por organismos sob condições ambientais adversas.

A determinação de atividades enzimáticas para estabelecer relação direta com fluxos metabólicos, bem como para determinar os valores de constantes cinéticas (constante de Michaelis (K_M), constante de inibidores (K_i), constantes catalíticas (k_{cat})), devem ser estabelecidas em condições de pH, temperatura, concentrações de substratos e cofatores, próximas das fisiológicas. Nesse sentido, Maggini *et al.* (1992), utilizaram sistema de reação em condições próximas da fisiológica (temperatura de 30 °C, pH 7,2, Mn^{2+} 30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e L-arginina variando entre zero e 8 mmol.L^{-1}) para estabelecer relação entre a atividade da arginase hepática de rato e a atividade do ciclo da ureia. No presente estudo, as constantes cinéticas das arginase de brânquias e pé muscular de *N. concinna*, bem como o efeito de cátions metálicos sobre a atividade argininolítica, foram determinadas em condições de temperatura (0 °C) e pH (7,4) próximos do fisiológico.

Contudo, se o objetivo for determinar a concentração enzimática como resultado da expressão gênica (aumento ou diminuição da quantidade de enzima

tecidual), a atividade enzimática específica deve ser determinada, preferencialmente, sob condições otimizadas. Nesse sentido, os métodos otimizados têm como principais vantagens a maior sensibilidade e a menor incidência de erros (BERGMEYER, 1983b; a).

Determinar a concentração da proteína enzimática é uma tarefa árdua e custosa, pois demanda purificação da proteína enzimática até a homogeneidade, bem como a determinação da sua massa molecular e da constante catalítica molar ($\text{kcat} \cdot \text{mol}^{-1}$). Apenas em situações muito específicas, a concentração da proteína enzimática é determinada. Nesse caso, as atividades enzimáticas específicas têm sido utilizadas como indicador da concentração enzimática, ou seja, concentração enzimática em termos de atividade (BUTTERWORTH, 1983).

A título de exemplo, diversos autores determinaram a atividade específica argininolítica, em condições não fisiológicas de temperatura e pH (9,5), comparando os níveis teciduais de arginase, como indicador da concentração de arginase (CARVAJAL *et al.*, 1984; AMINLARI & VASEGHI, 1992; JENKINSON *et al.*, 1996; SRIVASTAVA & RATHA, 2013b).

No presente estudo, os níveis de arginase de brânquias, pé muscular e *pool* dos demais tecidos moles, bem como a distribuição subcelular da concentração de arginase de *N. concinna*, foram determinadas na temperatura de 0 °C e pH 9,5, utilizando a atividade específica da enzima como indicador da concentração de arginase. Assim, a concentração de arginase, expressa pela atividade específica ($\text{mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína), foi utilizada como indicador dos níveis de arginase dos tecidos de *N. concinna*.

3.7.2. Validação de métodos

A via clássica para descobrir as condições ideais para determinação da concentração enzimática em tecidos e fluídos biológicos, reside em variar uma das variáveis e manter as demais constantes.

Embora exista uma vasta literatura descrevendo métodos otimizados para determinação da atividade de diversas enzimas, rigorosamente, esses devem ser validados nas condições analíticas de cada laboratório, contemplando as especificidades bioquímicas dos tecidos biológicos. A validação é essencial para impedir que erros expressivos sejam incorporados aos resultados das análises.

Os métodos otimizados consideram que a velocidade inicial da reação enzimática é uma função da concentração total da enzima ($[E]_t$). Nesse sentido, as concentrações de substratos dos sistemas de reação devem ser mantidas, sempre que possível, em níveis próximos da saturação, tornando os métodos mais seguros em relação ao tempo de reação e a manutenção de uma $[substrato] \gg [E]_t$ (BERGMAYER, 1983a). Mesmo assim, o tempo de reação não deve ser muito longo, pois só assim a velocidade da reação será inicial, considerando que essa condição pressupõe que apenas uma pequena fração do substrato (não mais de 5%) tenha sido transformada em produto.

A velocidade da reação enzimática pode ser determinada com concentrações sub saturantes de substrato, mas isso deve ser evitado, pois extratos livres de células podem conter substratos endógenos em concentrações expressivas. Nesse caso, o substrato extra pode elevar a velocidade enzimática e introduzir erro analítico (SEGEL, 1993). Todos os níveis enzimáticos do presente estudo foram determinados em condições otimizadas, atendendo os critérios de velocidade inicial.

Outrossim, nas condições de análise *in vitro*, onde $[substrato] \gg [E]_t$, a concentração enzimática de uma preparação impura (homogeneizado), pode ser expressa pela atividade específica ($U \cdot mg^{-1}$ proteína) (SEGEL, 1993). No presente estudo, essa premissa teórica foi validade para cada um dos métodos utilizados para estabelecer os níveis enzimáticos dos tecidos de *N. concinna*. Para tanto, os homogeneizados de brânquias, pé muscular, glândula digestiva e *pool* dos demais tecidos desse gastrópode foram testados previamente quanto ao efeito da concentração da enzima sobre a velocidade da reação. A linearidade entre concentração da enzima e a atividade enzimática mostra que a reação enzimática transcorreu sem interferência significativa dos demais constituintes do homogeneizado (inibidores, ativadores, etc).

Exemplificando, a linearidade entre o efeito da concentração da enzima fosfofrutoquinase (PFK) do pé muscular de *N. concinna* e a atividade enzimática (figura 12), mostra que a atividade específica da PFK varia linearmente em função da concentração da enzima. Esse comportamento cinético mostra que os demais constituintes do homogeneizado e os componentes do sistema de reação, não estão interferindo na velocidade da reação catalisada pela PFK. Nesse sentido, cabe

ressaltar que o sistema de reação da PFK utiliza enzimas auxiliares (glicerolfosfato desidrogenase, aldolase e triose fosfato isomerase), e estas devem estar em concentração muito superior à PFK, pois caso contrário, a etapa limitante da reação será determinada pelo sistema enzimático auxiliar, e não pela PFK (figura 13). Nesse caso, uma baixa atividade do sistema auxiliar (desnaturação de enzimas auxiliares e/ou erro de composição dessas enzimas), estaria alterando a linearidade da curva.

Todas as enzimas têm uma faixa de pH ótimo, na qual apresentam a sua maior atividade. O pH ótimo das enzimas nem sempre coincide com o pH fisiológico das células e tecidos. Valores de pH ótimo entre 9,5 e 10,5 têm sido descrito para arginases de diversos organismos (JENKINSON *et al.*, 1996). Contudo, o pH dos fluídos biológicos intracelulares, normalmente, estão em torno de 7,4. Sistemas de reação otimizados priorizam o pH ótimo, pois isso torna o método mais sensível.

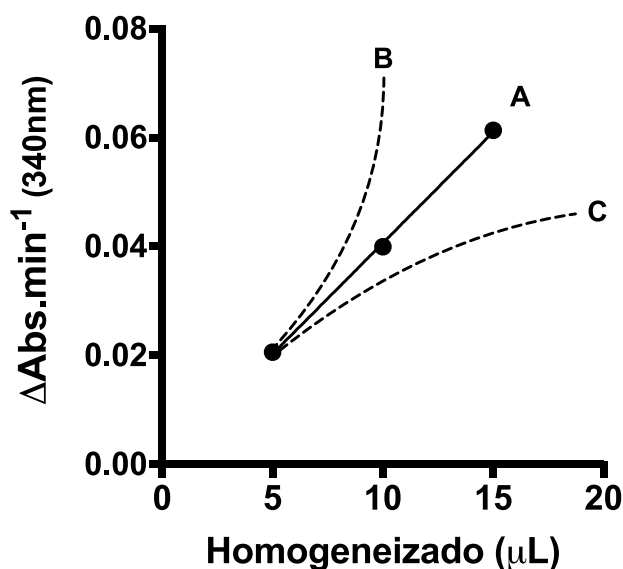


Figura 12. Efeito da concentração de fosfofrutoquinase (PFK) de *Nacella concinna* sobre a velocidade da reação. A linearidade da curva A mostra que a atividade da PFK não foi modulada por constituintes do homogeneizado, e nem limitada pelo sistema de reação. A curva hipotética B ilustra o efeito teórico de ativador(es) no homogeneizado. A curva hipotética C ilustra o efeito teórico de inibidor(es) no homogeneizado e/ou limitações do sistema auxiliar da reação. A atividade da PFK foi representada arbitrariamente pela variação da absorbância por minuto ($\Delta\text{Abs}.\text{min}^{-1}$). A quantidade de enzima é diretamente proporcional à tomada de ensaio do homogeneizado em μL (10 μL têm o dobro de PFK que 5 μL , e a atividade da PFK foi aproximadamente o dobro). Fonte: a autora (2017).

Por outro lado, algumas enzimas apresentam comportamento alostérico em pH fisiológico, o que pode resultar em erros na determinação da concentração enzimática em pH fisiológico (RODRIGUES *et al.*, 1994). Nesse sentido, e a título de exemplo, as PFKs apresentam comportamento alostérico em pH 7,2, mas não em

pH 8,2, onde seu comportamento é de enzima hiperbólica (KAMP *et al.*, 2007). Assim, o sistema de reação utilizado para determinar os níveis de PFK foi tamponado em pH 8,2. O sistema de reação utilizado no presente estudo para determinar os níveis de PFK, não contemplaram concentrações substratos, cofatores, pH, etc (ver material e métodos) próximos das condições fisiológicas dos fluidos biológicos teciduais. Assim, sob condições otimizadas, as medidas de atividade específica da PFK refletiram a concentração da enzima.

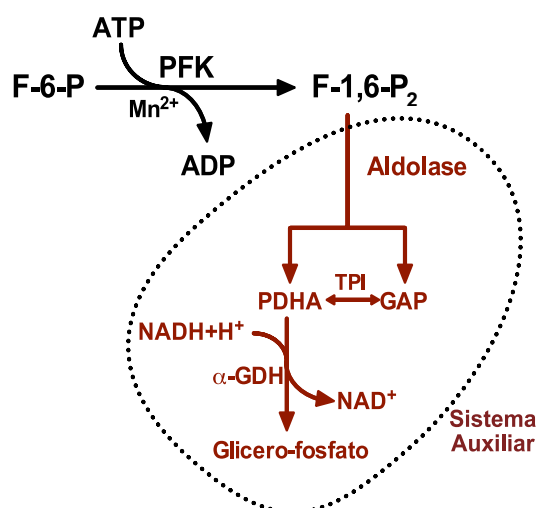


Figura 13. Reação de fosforilação da frutose-6-fosfato (F-6-P) em frutose-1,6-bisfosfato (F-1,6-P₂), catalisada pela fosfofrutoquinase (PFK). A F-1,6-P₂ formada na reação pode ser quantificada por um sistema auxiliar constituído pelas enzimas aldolase, triose-fosfato isomerase (TPI) e glicerolfosfato desidrogenase (α-GDH). A reação pode ser acompanhada em 340 nm, monitorando a oxidação da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida (NADH+H⁺) em oxidada (NAD⁺). PDHA: diidroxiacetona fosfato; GAP: gliceraldeído-3-fosfato; ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato. Fonte: a autora (2017).

Concluindo, as atividades enzimáticas determinadas em condições otimizadas, normalmente são várias vezes maiores do que a atividade enzimática em condições próximas das fisiológicas. Isso ocorre porque as enzimas no meio intracelular estão submetidas à concentrações sub saturantes de substratos e sofrem ação de outros fatores, que determinam uma atividade enzimática bem menor do que em condições otimizadas (NEWSHOLME & START, 1973). Dessa forma, os níveis de enzimas determinados em condições otimizadas sinalizam apenas o potencial metabólico de células e tecidos, como resultado da expressão gênica.

O aumento da temperatura pode instabilizar a estrutura proteica enzimática e promover desnaturação. Por outro lado, o aumento da temperatura em condições

não desnaturantes, aumenta número de colisões produtivas entre a enzima e o substrato, elevando a velocidade da reação (SEGEL, 1993).

A desorganização térmica da estrutura proteica é um processo normalmente irreversível que inviabiliza a catálise enzimática. Estudos com estenotérmicos antárticos e microrganismos psicrófilos mostraram que, pelo menos em parte, as enzimas desses organismos apresentam estruturas mais flexíveis, que proporcionam vantagens cinéticas em temperaturas sub-zero. Todavia, essas estruturas apresentam, normalmente, menor estabilidade térmica quando comparadas com enzimas homólogas de organismos de regiões tropicais (GEORLETTE *et al.*, 2003; GEORLETTE *et al.*, 2004; SOMERO, 2004). Assim, a premissa de que enzimas de organismos antárticos devem ser termicamente mais instáveis, foi considerado no presente estudo de validação dos métodos.

A falta de consenso na definição da melhor temperatura para determinação da atividade enzimática sob condições otimizadas tem gerado polêmica. Em 1961, a União Internacional de Bioquímica (IUB, *International Union of Biochemistry*) recomendou a temperatura termodinâmica de 25 °C para análises enzimáticas. Essa recomendação foi alterada pela própria IUB para 30 °C em 1964. Assim, especialistas do painel em enzimas da Federação Internacional de Química Clínica (IFCC, *International Federation of Clinical Chemistry*) também recomendaram essa temperatura para análises clínicas enzimológicas. Contudo, a temperatura de 37 °C foi adotada por algumas entidades de análises clínicas para determinação da concentração de enzimas no soro humano. Nesse caso, a principal crítica reside no tempo de exposição, onde algumas enzimas humanas se apresentam instáveis à 37 °C. Outra crítica, reside na perda de calor para o ar ao redor do sistema de reação, a qual é mais rápida e dificulta o controle da temperatura em sistemas automatizados. Fatores de conversão para atividades enzimáticas determinadas em diferentes temperaturas (30 °C ou 37 °C), têm sido estabelecidos para comparar resultados entre laboratórios de análises clínicas (BERGMEYER, 1983a; BURTIS & ASHWOOD, 1994).

A temperatura de 30 °C não é fisiológica para humanos. Contudo, isso não inviabiliza a utilização dos níveis de enzimas séricas à 30 °C como exame complementar ao diagnóstico clínico, contanto que os valores de referência tenham sido determinados na mesma condição térmica. Temperaturas mais elevadas (não

desnaturantes), tornam os métodos enzimáticos mais sensíveis, mas a escolha deve ser feita com muita cautela.

Bioquímicos e fisiologistas têm escolhido temperaturas não fisiológicas para determinar a atividade específica enzimática de organismos antárticos. Embora Abele *et al.* (2001) tenham conduzido os experimentos com o bivalve antártico *Yoldia eightsi* em temperaturas próximas da fisiológica, as determinações enzimáticas foram realizadas à 20 °C. Os autores também utilizaram o termo “níveis de enzimas” para expressar as “concentrações enzimáticas”, semelhante à decisão tomada no presente estudo.

Assim, diversos autores determinaram a concentração de enzimas de organismos antárticos em temperaturas não fisiológicas: Abele *et al.* (1998) – *Nacella concinna* – 20 °C; Ghosh *et al.* (2013) – *Trematomus bernacchii* – 20 °C; Ciardiello *et al.* (1999) – *Chaenocephalus aceratus* – 25 °C; Ciardiello *et al.* (1995) – teleósteos antárticos – 20 °C; Kawall *et al.* (2002) – peixes antárticos – 10 °C; Park *et al.* (2009) – *Laternula elliptica* – 25 °C.

Por outro lado, medidas de atividade em temperaturas próximas das fisiológicas de organismos antárticos, foram realizadas com o objetivo de estabelecer relação entre a atividade enzimática e/ou constantes cinéticas da reação e a performance de sistemas fisiológicos (DUNN & JOHNSTON, 1986; MAFFIA *et al.*, 1993; RODRIGUES *et al.*, 1994; PÖRTNER *et al.*, 1999a; STROBEL *et al.*, 2015).

A estabilidade térmica enzimática de organismos antárticos, basicamente peixes e invertebrados, tem sido avaliada no laboratório de bioquímica da Universidade de Taubaté. Todas as enzimas analisadas no presente estudo se mostraram estáveis à 20 °C por pelo menos 30 minutos. Comparativamente, as enzimas de *N. concinna* se mostraram termicamente mais estáveis do que as enzimas homólogas de peixes antárticos, que são estenotérmicos. Dentre as enzimas de peixes antárticos, a arginase hepática do peixe antártico *Notothenia coriiceps*, apresentou a menor estabilidade térmica (figura 14).

Comparativamente, arginases homólogas de vertebrados homeotérmicos, normalmente, são estáveis por 5 à 10 minutos em temperaturas de 55 – 65 °C. Nesse sentido, a arginase da glândula mamária de rato perdeu apenas 16% de

atividade quando incubada a 55 °C durante 20 minutos (JENKINSON & GRIGOR, 1994). Assim, o experimento da figura 14 mostra que a estabilidade térmica enzimática é espécie dependente.

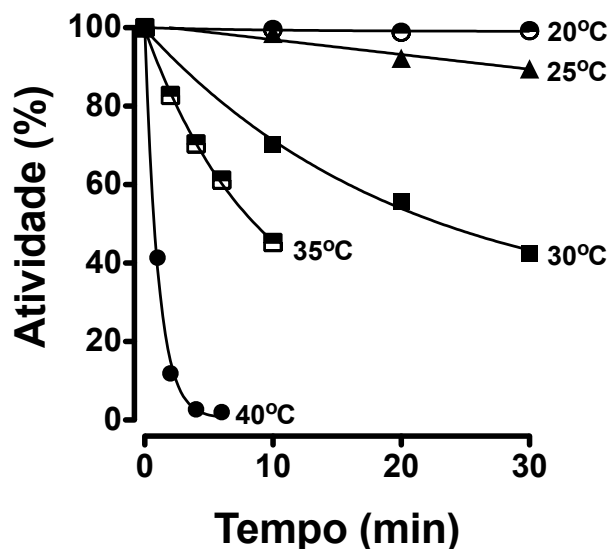


Figura 14. Estabilidade térmica da arginase hepática de *Notothenia coriiceps*. Alíquotas de homogeneizados foram mantidas durante tempo determinado nas temperaturas de 20, 25, 30, 35 e 40 °C. Decorrido o tempo, as alíquotas dos homogeneizados foram utilizadas na determinação da atividade residual argininolítica, na temperatura de 20 °C. Fonte: a autora (2017).

Finalizando, se o objetivo for avaliar o efeito de fatores naturais ou antrópicos sobre a expressão gênica de enzimas (níveis teciduais de enzimas), a atividade específica (U.mg^{-1} de proteína) enzimática pode ser determinada em condições otimizadas, rigorosamente validadas nas condições experimentais de cada laboratório. Por outro lado, se o objetivo for avaliar o comportamento cinético de enzimas em condições fisiológicas, a atividade enzimática deve ser, rigorosamente, determinada em condições próximas das fisiológicas. Por exemplo, Crockett & Sidell (1990) compararam as propriedades cinéticas de enzimas de peixes antárticos com as de peixes de regiões temperadas como indicadores bioquímicos de adaptação ao frio, mostrando que enzimas do metabolismo energético anaeróbio e aeróbio são cineticamente mais preparadas e adaptadas para catálise em baixas temperaturas. Nesse caso, as medidas de atividade, necessariamente, foram realizadas na temperatura fisiológica de 1 °C e no estresse térmico de 10 °C.

Independentemente do método enzimático utilizado para determinação da atividade enzimática, o intervalo de tempo entre o início da preparação dos homogeneizados livres de células e a finalização das medidas de atividade

enzimática, deve ser suficientemente curto para que as enzimas não sofram desnaturação, seja por temperatura, ou pela ação outros fatores (ação de proteases, etc). Portanto, no presente estudo, também foram determinadas a estabilidade das enzimas nos homogeneizados, sendo que algumas enzimas se mostraram estáveis por apenas 3h, nas condições dos homogeneizados. Os estudos também mostraram que algumas enzimas perderam atividade quando os homogeneizados foram congelados em -20°C , ou mesmo em -80°C , inviabilizando o congelamento dos homogeneizados para posterior determinação da atividade enzimática.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do aquecimento e da baixa salinidade sobre o metabolismo de *Nacella concinna* ao longo do tempo

Todos os animais sobreviveram às condições experimentais dos bioensaios. Contudo, na condição termo-salina 0 °C – 25 psu, no tempo de 24 horas, os espécimes de *Nacella concinna* foram removidos facilmente das paredes dos aquários e um deles estava solto no fundo. Também foi observado acúmulo de líquido na cavidade do manto de dois espécimes da condição experimental termo-salina 4 °C – 25 psu, no tempo de 48 horas.

4.1.1. Defesa antioxidante

Os efeitos do aquecimento e da baixa salinidade sobre os níveis de enzimas da defesa antioxidante das brânquias de *N. concinna*, ao longo do tempo de experimentação, podem ser visto na figura 15. O aquecimento em 4 °C elevou em 9% os níveis de SOD (figura 15 E) e, de forma oposta e com a mesma intensidade, reduziu os níveis de CAT (figura 15 F). A baixa salinidade elevou em 29% os níveis de G6PDH (figura 15 G). Uma leve interação tempo-temperatura ($p=0,046$) foi capaz de elevar os níveis de SOD (figura 15 H), no tempo de 48 h em 0 °C e no tempo de 12h em 4 °C. Os níveis de GR não foram modulados pelo aquecimento e baixa salinidade no curso do tempo. Os valores de p obtidos no teste ANOVA trifatorial estão sumarizados na figura 15 I. Não foram encontradas diferenças significativas entre os níveis enzimáticos dos animais do referencial da natureza, quando comparado aos animais da condição termo-salina 0 °C – 35 psu no tempo zero.

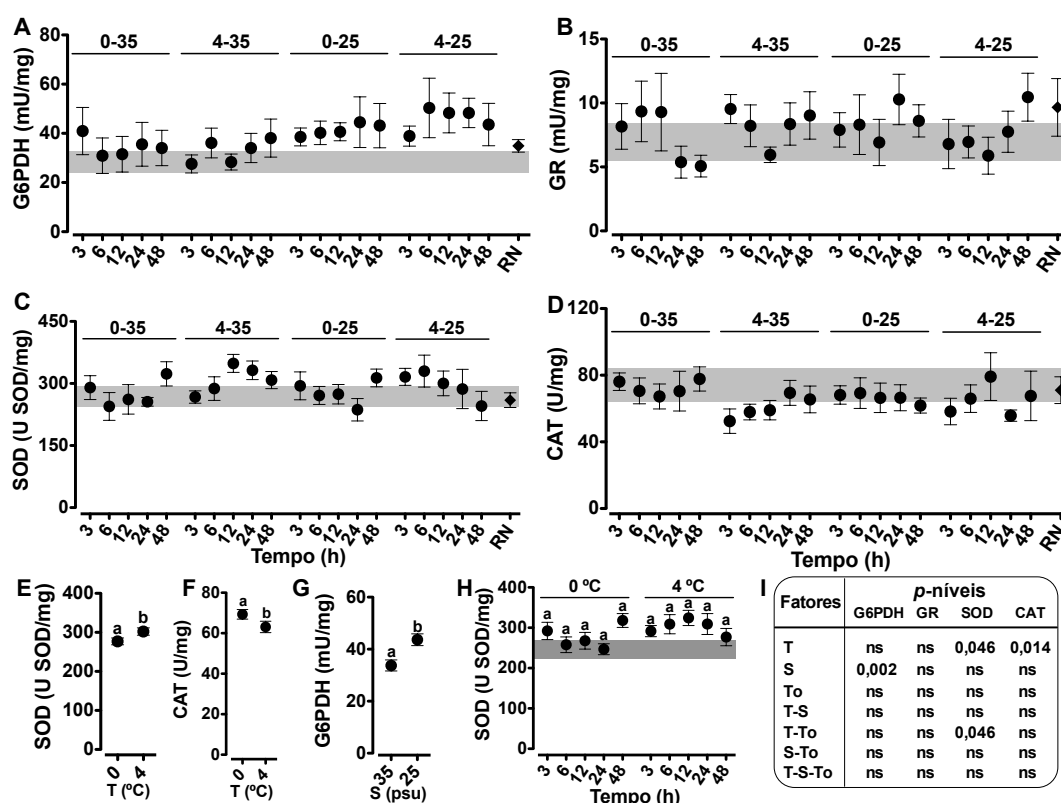


Figura 15. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e do tempo (To) de aclimação sobre os níveis de enzimas da defesa antioxidante das brânquias de *Nacella concinna*. Os níveis das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH; A), glutationa redutase (GR; B), superóxido dismutase (SOD; C) e catalase (CAT; D) foram acessados ao longo de 48 h, nas condições termo-salinas de 0 °C - 35 psu (0-35), 4 °C - 35 psu (4-35), 0 °C - 25 psu (0-25) e 4 °C - 25 psu (4-25). Os níveis dessas enzimas também foram determinados nas brânquias de animais imediatamente removidos da natureza (referencial da natureza; RN). As faixas cinzas, paralelas aos eixos das ordenadas, se referem ao nível das enzimas em 0 °C - 35 psu no tempo zero. Gráficos secundários (E até H) mostram o efeito isolado de fatores e das suas interações. Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro I, onde ns indica não significativo. Letras diferentes acima dos níveis enzimáticos indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

Os efeitos do aquecimento e da baixa salinidade sobre os níveis de enzimas a defesa antioxidante do pé muscular de *N. concinna*, ao longo do tempo de experimentação, pode ser visto na figura 16. O aquecimento em 4 °C elevou em 28% os níveis de G6PDH (figura 16 E) e a hipossalinidade elevou em 9% os níveis de SOD (figura 16 F). O aquecimento e a baixa salinidade não foram capazes de modular os níveis de GR e CAT. Os níveis das enzimas da defesa antioxidante do pé muscular de *N. concinna* não foram moduladas por interações entre fatores (figura 16 G). Ao comparar os níveis das enzimas dos animais do referencial da natureza com os da condição termo-salina 0-35 no tempo zero, foi observado níveis

de G6PDH significativamente superiores nos animais do referencial da natureza ($p=0,0006$). Contudo, as outras enzimas não apresentaram diferenças significativas.

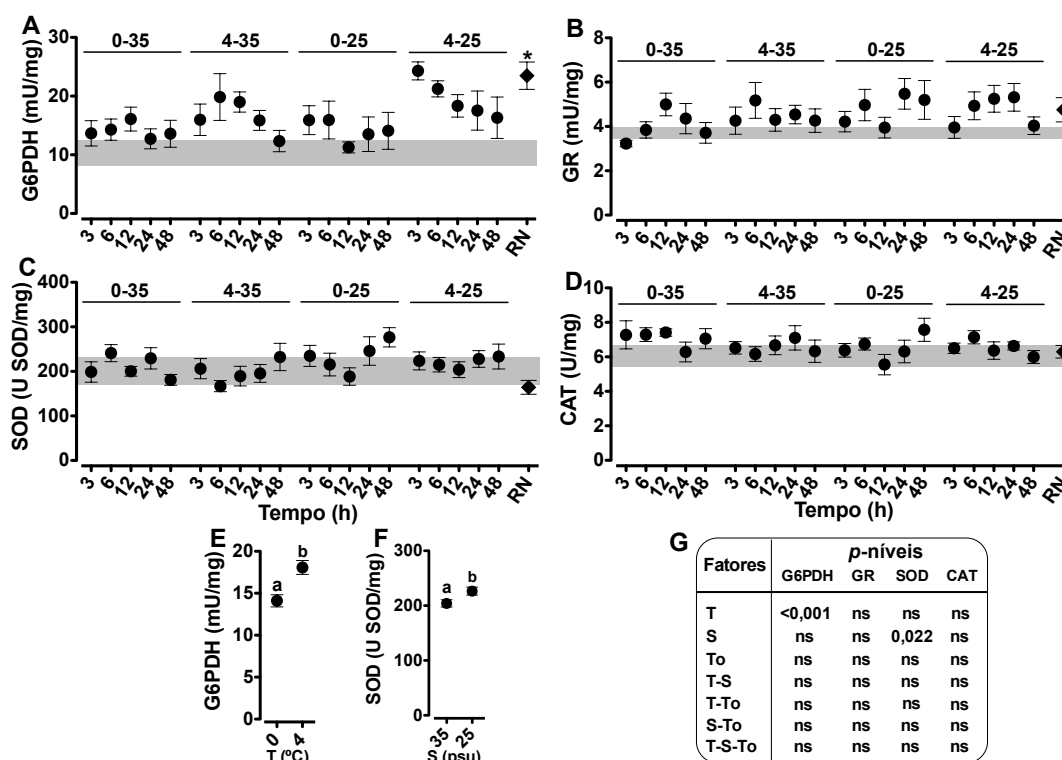


Figura 16. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e do tempo (To) de aclimação sobre os níveis de enzimas da defesa antioxidante do pé muscular de *Nacella concinna*. Os níveis das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH; A), glutathione redutase (GR; B), superóxido dismutase (SOD; C) e catalase (CAT; D) foram acessados ao longo de 48 h, nas condições termo-salinas de 0 °C - 35 psu (0-35), 4 °C - 35 psu (4-35), 0 °C - 25 psu (0-25) e 4 °C - 25 psu (4-25). Os níveis dessas enzimas também foram determinados no pé muscular de animais imediatamente removidos da natureza (referencial da natureza; RN). As faixas cinzas, paralelas aos eixos das ordenadas, se referem ao nível das enzimas em 0 °C - 35 psu no tempo zero. O asterisco acima de RN indica diferença significativa ($p<0,05$) entre RN e 0-35 tempo zero. Gráficos secundários (E até F) mostram o efeito isolado de fatores e das suas interações. Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro G, onde ns indica não significativo. Letras diferentes acima dos níveis enzimáticos indicam diferenças significativas para $p<0,05$.

Os efeitos do aquecimento e hipossalinidade sobre os níveis de enzimas da defesa antioxidante da glândula digestiva de *N. concinna*, ao longo do tempo de experimentação, pode ser visto na figura 17. O aquecimento em 4 °C elevou em 14% os níveis de GST (figura 17 G). Já a hipossalinidade foi capaz de elevar em 21% os níveis de G6PDH (figura 17 H) e os de SOD em 19% (figura 17 I). Independente da condição termo-salina, os níveis de G6PDH sofreram elevação no tempo de 6 h e gradual redução nos tempos subsequentes (figura 17 J). Já os níveis de GR foram modulados por uma interação termo-salina-tempo (figura 17 B e F). Os níveis de CAT não foram modulados por nenhum dos fatores, isolados ou com

interações (figura 17 D e F). Não houveram diferenças significativas entre os níveis enzimáticos dos animais do referencial da natureza, quando comparado aos animais da condição termo-salina 0 °C – 35 psu, tempo zero.

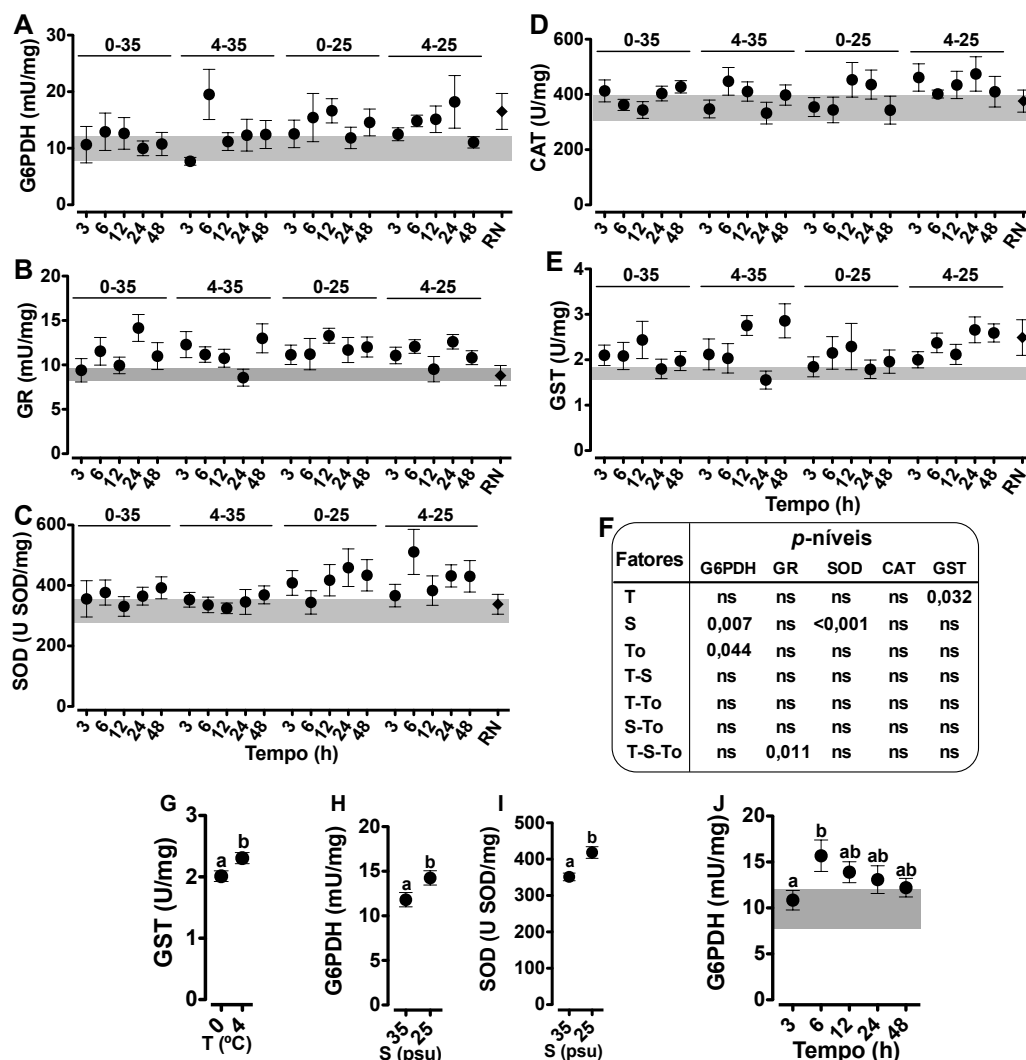


Figura 17. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e do tempo (To) de aclimação sobre os níveis de enzimas da defesa antioxidante da glândula digestiva de *Nacella concinna*. Os níveis das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH; A), glutathiona redutase (GR; B), superóxido dismutase (SOD; C), catalase (CAT; D) e glutathiona-s-transferase (GST; E) foram acessados ao longo de 48 h, nas condições termo-salinas de 0 °C - 35 psu (0-35), 4 °C - 35 psu (4-35), 0 °C - 25 psu (0-25) e 4 °C - 25 psu (4-25). Os níveis dessas enzimas também foram determinados na glândula digestiva de animais imediatamente removidos da natureza (referencial da natureza; RN). As faixas cinzas, paralelas aos eixos das ordenadas, se referem ao nível das enzimas em 0 °C - 35 psu no tempo zero. Gráficos secundários (G até J) mostram o efeito isolado de fatores e das suas interações. Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro F, onde ns indica não significativo. Letras diferentes acima dos níveis enzimáticos indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

Os efeitos do aquecimento e da baixa salinidade sobre os níveis de marcadores de lesões oxidativas da glândula digestiva de *N. concinna*, ao longo do tempo de experimentação, pode ser visto na figura 18. Os níveis de LPO da glândula

digestiva não foram modulados em nenhuma das condições experimentais, nem pela interação entre os fatores determinantes das condições experimentais (figura 18 A e D). Os níveis de PCO foram modulados negativamente por uma interação termo-salina em 4 °C e 25 psu, comparado a condição termo-salina 0 °C e 25 psu (figura 18 C). Os valores de p obtidos no teste ANOVA trifatorial estão sumarizados na figura 18 D. Não foram encontradas diferenças significativas entre os níveis dos marcadores LPO e PCO dos animais do referencial da natureza, quando comparado aos animais da condição termo-salina 0 °C - 35 psu no tempo zero.

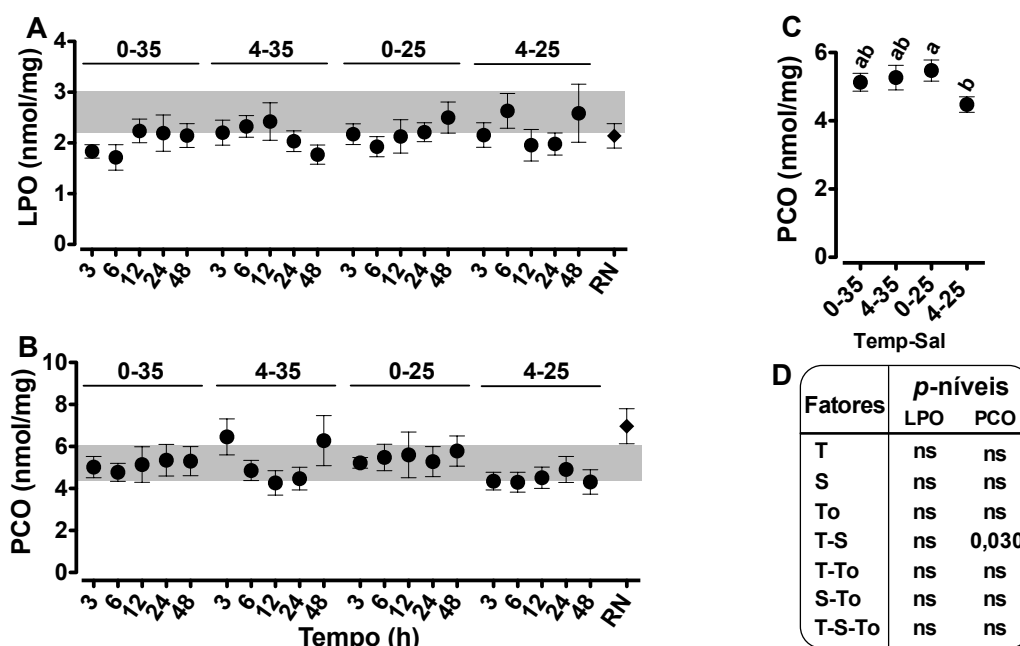


Figura 18. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e do tempo (To) de aclimação sobre os níveis de lipoperoxidação (LPO) e proteínas carboniladas (PCO) da glândula digestiva de *Nacella concinna*. Os níveis de LPO (A) e PCO (B) foram acessados ao longo de 48 h, nas condições termo-salinas de 0 °C - 35 psu (0-35), 4 °C - 35 psu (4-35), 0 °C - 25 psu (0-25) e 4 °C - 25 psu (4-25). Também foram determinados LPO e PCO na glândula digestiva de animais imediatamente removidos da natureza (referencial da natureza; RN). As faixas cinzas, paralelas aos eixos das ordenadas, se referem ao nível das enzimas em 0 °C - 35 psu no tempo zero. O gráfico secundário (C) mostra o efeito da interação tempo-temperatura. Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro D, onde ns indica não significativo. Letras diferentes acima dos níveis enzimáticos indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

4.1.2. Metabolismo energético e nitrogenado

Os efeitos do aquecimento e da baixa salinidade sobre os níveis de enzimas da via glicolítica branquial de *N. concinna*, ao longo do tempo de experimentação, podem ser vistos na figura 19. HK, PK e LDH não foram moduladas em nenhuma das condições experimentais. Os níveis de PFK aumentaram na baixa salinidade e por uma forte interação termo-salina (figura 19 E). Os valores de p do teste ANOVA

trifatorial estão sumarizados na figura 19 F. Não foram encontradas diferenças significativas entre os níveis enzimáticos dos animais do referencial da natureza, quando comparado aos animais da condição termo-salina 0 °C – 35 psu, tempo zero.

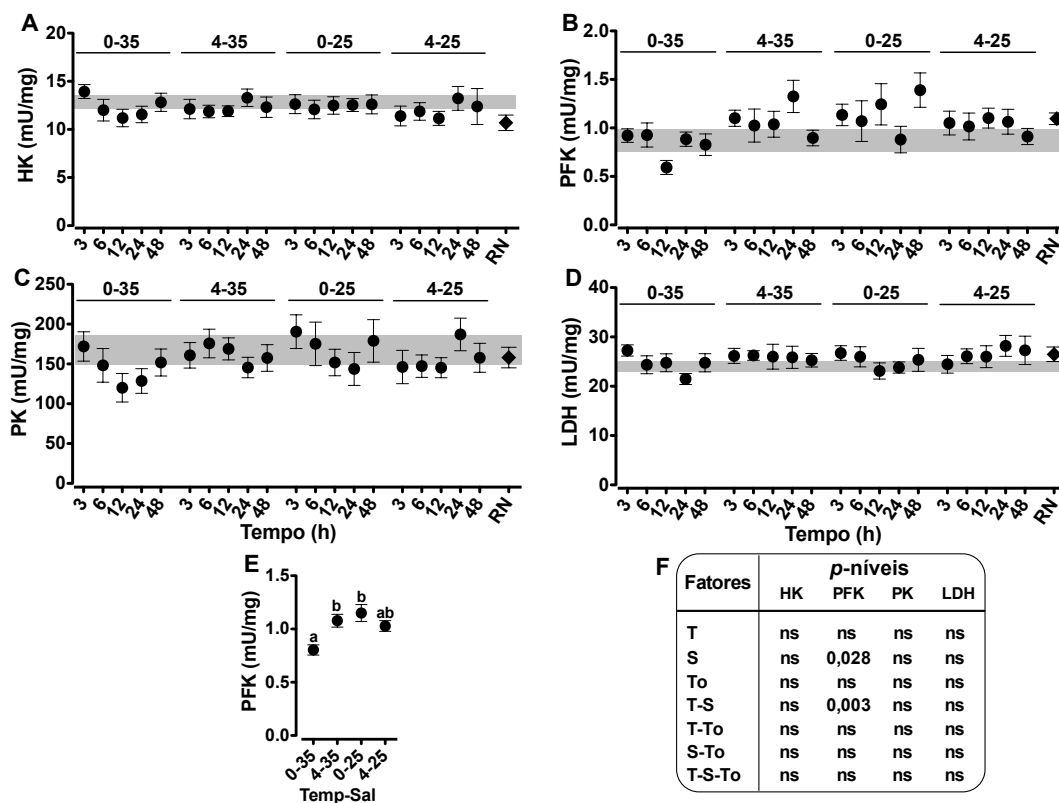


Figura 19. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e do tempo (To) de aclimação sobre os níveis de enzimas do metabolismo energético branquial de *Nacella concinna*. Os níveis de hexoquinase (HK; A), fosfofrutoquinase (PFK; B), piruvato quinase (PK; C) e lactato desidrogenase (LDH; D) foram acessados ao longo de 48 h, nas condições termo-salinas de 0 °C - 35 psu (0-35), 4 °C - 35 psu (4-35), 0 °C - 25 psu (0-25) e 4 °C - 25 psu (4-25). Os níveis dessas enzimas também foram determinados nas brânquias de animais imediatamente removidos da natureza (referencial da natureza; RN). As faixas cinzas, paralelas aos eixos das ordenadas, se referem ao nível das enzimas em 0 °C 35 psu no tempo zero. O gráfico secundário mostra o efeito da forte interação termo-salina (E) sobre os níveis de PFK. Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro F, onde ns indica não significativo. Letras diferentes acima dos níveis enzimáticos indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

Os efeitos do aquecimento e hipossalinidade sobre os níveis de enzimas do ciclo do ácido cítrico de brânquias de *N. concinna*, ao longo do tempo de experimentação, podem ser vistos na figura 20. Os níveis das enzimas CS e IDH aumentaram na hipossalinidade (figura 20 D e F). Por outro lado, os níveis de IDH diminuíram em função de uma interação temperatura-tempo (figura 20 E). Já os níveis de MDH foram modulados negativamente por uma forte interação salinidade-tempo (figura 20 G). Os valores de p obtidos no teste ANOVA trifatorial estão

sumarizados na figura 20 H. Não foram encontradas diferenças significativas entre os níveis enzimáticos dos animais do referencial da natureza, quando comparado aos animais da condição termo-salina 0 °C – 35 psu no tempo zero.

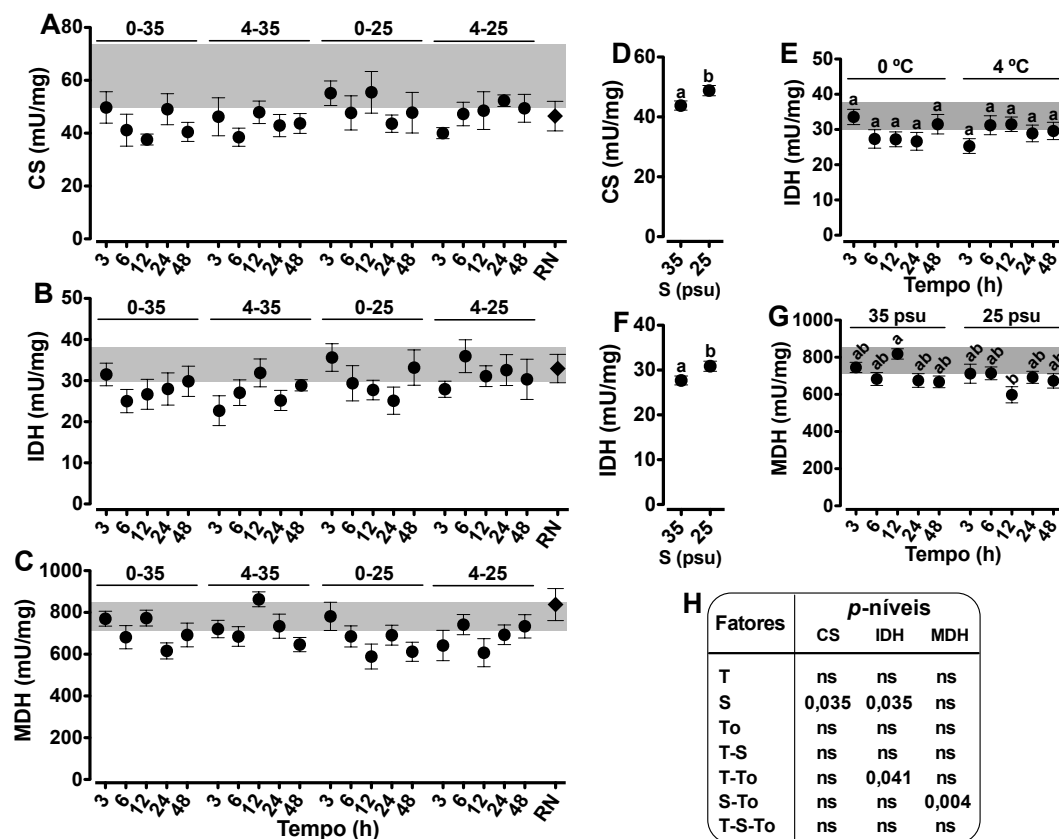


Figura 20. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e tempo (To) de aclimação sobre os níveis de enzimas do ciclo do ácido cítrico de brânquias de *Nacella concinna*. Os níveis de citrato sintase (CS; A), isocitrato desidrogenase (IDH; B) e malato desidrogenase (MDH; C) foram acessados ao longo de 48 h, nas condições termo-salinas de 0 °C - 35 psu (0-35), 4 °C - 35 psu (4-35), 0 °C - 25 psu (0-25) e 4 °C - 25 psu (4-25). Os níveis dessas enzimas também foram determinados nas brânquias de animais imediatamente removidos da natureza (referencial da natureza; RN). As faixas cinzas, paralelas aos eixos das ordenadas, se referem ao nível das enzimas em 0 °C - 35 psu no tempo zero. Gráficos secundários mostram o efeito isolado de fatores (D, F) e de interações (E, G). Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro H, onde ns indica não significativo. Letras diferentes acima dos níveis enzimáticos indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

Os níveis de GDH ficaram abaixo do limite de detecção do método nas brânquias de *N. concinna*. Os efeitos da temperatura e da salinidade, no curso do tempo, sobre os níveis de ARG do tecido branquial de *N. concinna* podem ser vistos na figura 21. Os níveis de ARG aumentaram inicialmente no tempo de 3 h, sofrendo redução gradual nos tempos subsequentes (figura 21 B). Também ficou evidente uma interação entre temperatura e tempo capaz de elevar os níveis da ARG na condição 4 °C – 3 h e reduzir na condição 4 °C – 6 h (figura 21 C). Os valores de p obtidos no teste ANOVA trifatorial estão sumarizados na figura 21 D. Não foram

encontradas diferenças significativas entre os níveis enzimáticos dos animais do referencial da natureza, quando comparado aos animais da condição termo-salina 0 °C -35 psu no tempo zero.

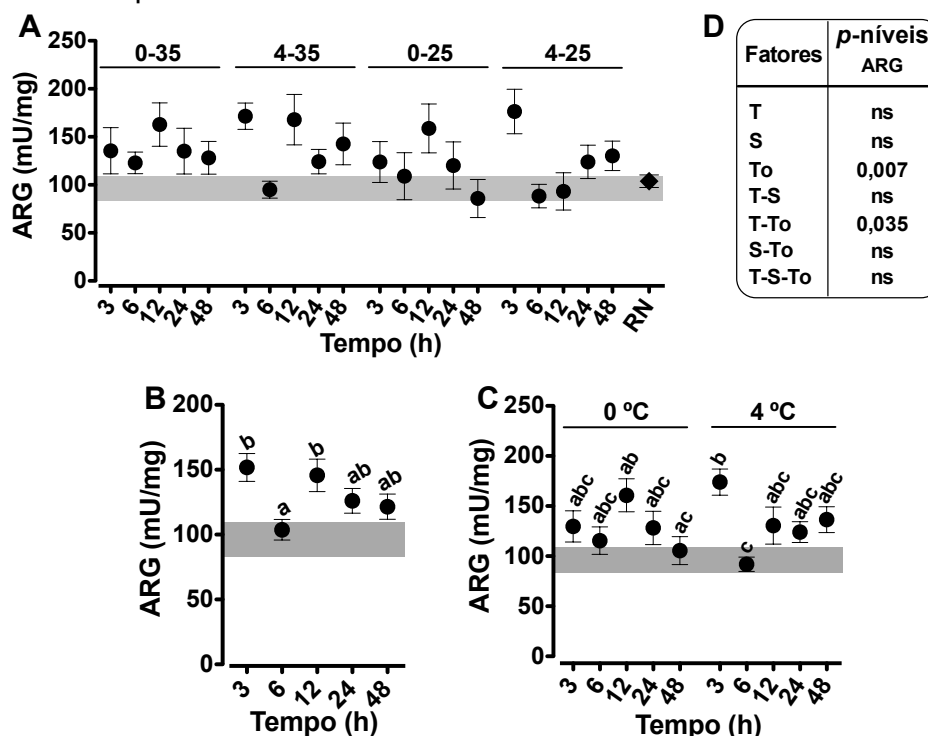


Figura 21. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e tempo (To) de aclimação sobre os o metabolismo nitrogenado branquial de *Nacella concinna*. Os níveis de arginase (ARG) foram acessados ao longo de 48 horas, nas condições termo-salinas de 0 °C - 35 psu (0-35), 4 °C - 35 psu (4-35), 0 °C - 25 psu (0-25) e 4 °C - 25 psu (4-25). Os níveis dessa enzima também foram determinados nas brânquias de animais imediatamente removidos da natureza (referencial da natureza; RN). As faixas cinzas, paralelas aos eixos das ordenadas, se referem ao nível das enzimas em 0 °C - 35 psu no tempo zero. Gráficos secundários mostram o efeito isolado do tempo (B) e da interação temperatura-tempo (C). Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro D, onde ns indica não significativo. Letras diferentes acima dos níveis enzimáticos indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

Os níveis das enzimas SDH, ADH, PEPCK e PC do metabolismo energético do pé muscular de *N. concinna* ficaram abaixo do limite de detecção dos métodos utilizados.

Os efeitos do aquecimento e da baixa salinidade sobre os níveis de enzimas da via glicolítica do pé muscular de *N. concinna*, ao longo do tempo de experimentação, podem ser vistos na figura 22. O aquecimento em 4 °C elevou os níveis das enzimas HK, PFK e PK (figura 22 D, E e F), sendo que os níveis de PK também sofreram elevação na baixa salinidade (figura 22 G). Uma forte interação entre temperatura e tempo modulou os níveis de HK, sendo que em 0 °C - 12 h, os níveis da enzima estavam significativamente menores do que em 0 °C - 48 h e 4 °C

– 3, 6, 12 e 24 h (figura 22 H). Os níveis de PK foram modulados por interação salinidade-tempo, com níveis da enzima significativamente maiores de PK em 25 psu – 6 h, comparado com 35 psu – 6 e 48 h (figura 22 I). Os valores de p obtidos no teste ANOVA trifatorial estão sumarizados na figura 22 J. Não foram encontradas diferenças significativas entre os níveis enzimáticos dos animais do referencial da natureza, quando comparado aos animais da condição termo-salina 0 °C – 35 psu no tempo zero.

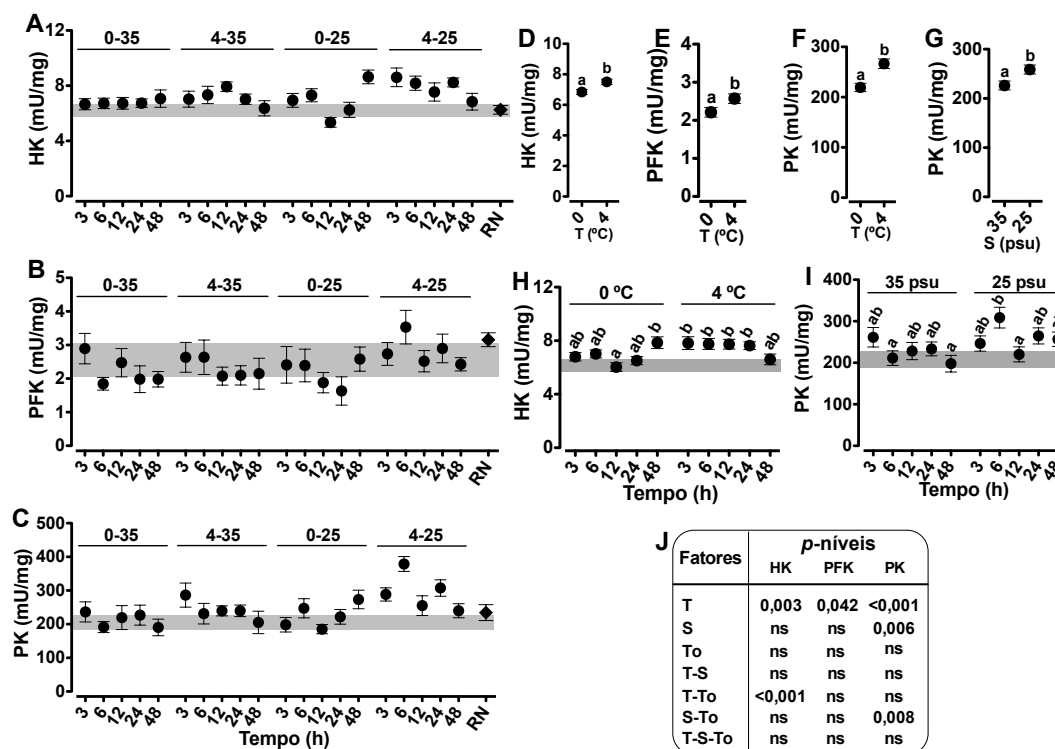


Figura 22. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e do tempo (To) de aclimação sobre os níveis de enzimas glicolíticas do pé muscular de *Nacella concinna*. Os níveis de hexoquinase (HK; A), fosfofrutoquinase (PFK; B) e piruvato quinase (PK; C) foram acessados ao longo de 48 h, nas condições termo-salinas de 0 °C - 35 psu (0-35), 4 °C - 35 psu (4-35), 0 °C - 25 psu (0-25) e 4 °C - 25 psu (4-25). Os níveis dessas enzimas também foram determinados no pé muscular de animais imediatamente removidos da natureza (referencial da natureza; RN). As faixas cinzas, paralelas aos eixos das ordenadas, se referem ao nível das enzimas em 0 °C - 35 psu no tempo zero. Os gráficos secundários mostram o efeito isolado da temperatura sobre os níveis de enzimas HK (D), PFK (E) e PK (F); da salinidade sobre os níveis de PK (G); e das interações temperatura-tempo sobre os níveis de HK (H) e salinidade-tempo sobre os níveis de PK (I). Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro J, onde ns indica não significativo. Letras diferentes acima dos níveis enzimáticos indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

Os efeitos do aquecimento e da baixa salinidade sobre os níveis de enzimas do metabolismo energético anaeróbico do pé muscular de *N. concinna*, ao longo do tempo de experimentação, podem ser visto na figura 23. O aquecimento em 4 °C não foi capaz de modular significativamente os níveis das enzimas LDH, ODH, AST

e ALT. Contudo, a baixa salinidade elevou AST no pé muscular (figura 23 E). Os níveis de ALT (figura 23 F) foram modulados negativamente em relação ao tempo zero. Já no caso da LDH, essa modulação foi preponderantemente exercida por interação entre salinidade e tempo (Figura 23 G). Também foi observada interação termo-salina-tempo capaz de modular os níveis de ODH (figura 23 B) e AST (figura 23 D). Os valores de p obtidos no teste ANOVA trifatorial estão sumarizados na figura 23 H. Não foram encontradas diferenças significativas entre os níveis enzimáticos dos animais do referencial da natureza, quando comparado aos animais da condição termo-salina 0 °C – 35 psu, tempo zero.

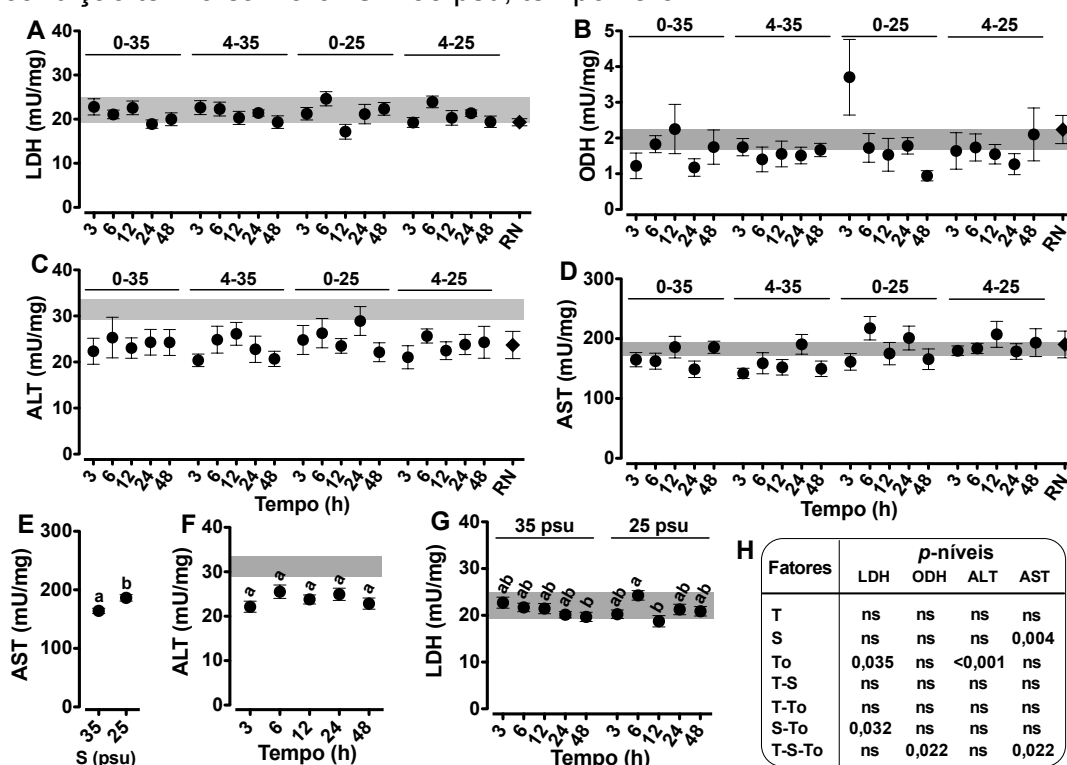


Figura 23. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e do tempo (To) de aclimação sobre o metabolismo anaeróbico do pé muscular de *Nacella concinna*. Os níveis de lactato desidrogenase (LDH; A), octopina desidrogenase (ODH; B), alanina aminotransferase (ALT; C) e aspartato aminotransferase (AST, D), foram acessados ao longo de 48 h, nas condições termo-salinas de 0 °C - 35 psu (0-35), 4 °C - 35 psu (4-35), 0 °C - 25 psu (0-25) e 4 °C - 25 psu (4-25). Os níveis dessas enzimas também foram determinados no pé muscular de animais imediatamente removidos da natureza (referencial da natureza; RN). As faixas cinzas, paralelas aos eixos das ordenadas, se referem ao nível das enzimas em 0 °C - 35 psu no tempo zero. Os gráficos secundários mostram o efeito isolado da salinidade sobre os níveis de AST (E); do tempo sobre os níveis de ALT (F) e da interação salinidade-tempo sobre os níveis de LDH (G). Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro H, onde ns indica não significativo. Letras diferentes acima dos níveis enzimáticos indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

Os efeitos do aquecimento e da baixa salinidade sobre os níveis de enzimas do ciclo do ácido cítrico do pé muscular de *N. concinna*, ao longo do tempo de

experimentação, podem ser visto na figura 24. Isoladamente, nenhum dos fatores experimentais foi capaz de modular os níveis de CS, IDH e MDH. Entretanto, a interação entre salinidade e tempo modulou os níveis de IDH e MDH. Foi observado um aumento dos níveis de IDH no tempo de 12 h, na salinidade de 35, sendo que na salinidade de 25 o aumento ocorreu no tempo de 6 h (figura 24 D). Já os níveis de MDH sofreram redução gradativa ao longo do tempo na salinidade de 35. Na salinidade de 25, foi observado uma elevação de MDH em 6 h e subsequente redução no tempo de 12 h quando comparado à 6 h (figura 24 E). Os valores de p obtidos no teste ANOVA trifatorial estão sumarizados na figura 24 F. Não foram encontradas diferenças significativas entre os níveis enzimáticos dos animais do referencial da natureza, quando comparado aos animais da condição termo-salina 0 °C – 35 psu no tempo zero.

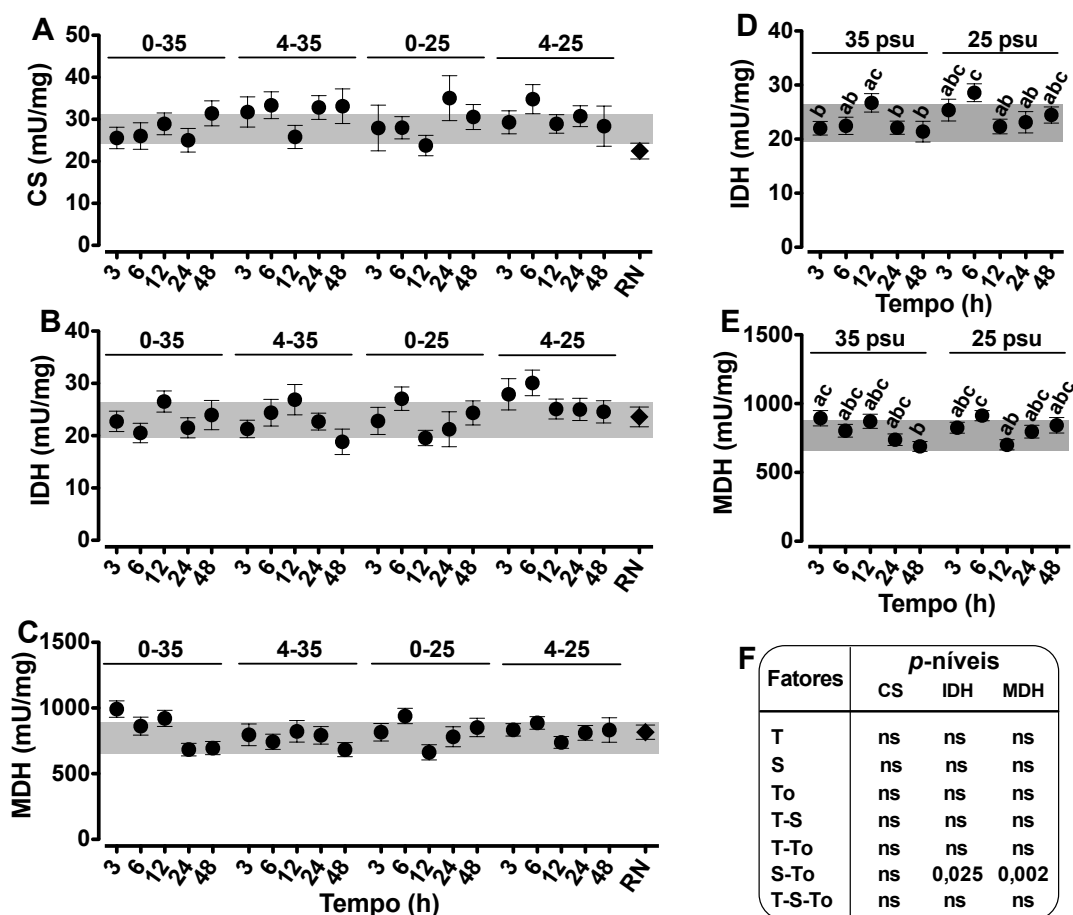


Figura 24. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e do tempo (To) de aclimação sobre os níveis de enzimas do ciclo do ácido cítrico do pé muscular de *Nacella concinna*. Os níveis de citrato sintase (CS; A), isocitrato desidrogenase (IDH; B) e malato desidrogenase (MDH; C) foram acessados ao longo de 48 h, nas condições termo-salinas de 0 °C - 35 psu (0-35), 4 °C - 35 psu (4-35), 0 °C - 25 psu (0-25) e 4 °C - 25 psu (4-25). Os níveis dessas enzimas também foram determinados no pé muscular de animais imediatamente removidos da natureza (referencial da natureza; RN). As faixas cinzas, paralelas aos eixos das ordenadas, se referem ao nível das enzimas em 0 °C - 35 psu no tempo zero. Os gráficos secundários mostram o efeito da interação salinidade-tempo sobre os níveis de IDH (D) e MDH (E). Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro F, onde ns indica não significativo. Letras diferentes acima dos níveis enzimáticos indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

Os efeitos do aquecimento e da baixa salinidade sobre os níveis de enzimas do metabolismo nitrogenado do pé muscular de *N. concinna*, ao longo do tempo de experimentação, podem ser visto na figura 25. Os níveis de ARG não foram modulados isoladamente por nenhum dos fatores experimentais e nem por interações entre os fatores. Já os níveis de GDH aumentaram na salinidade de 25 (figura 25 C). Os valores de p obtidos no teste ANOVA trifatorial estão sumarizados na figura 25 D. Não foram encontradas diferenças significativas entre os níveis

enzimáticos dos animais do referencial da natureza, quando comparado aos animais da condição termo-salina 0 °C – 35 psu no tempo zero.

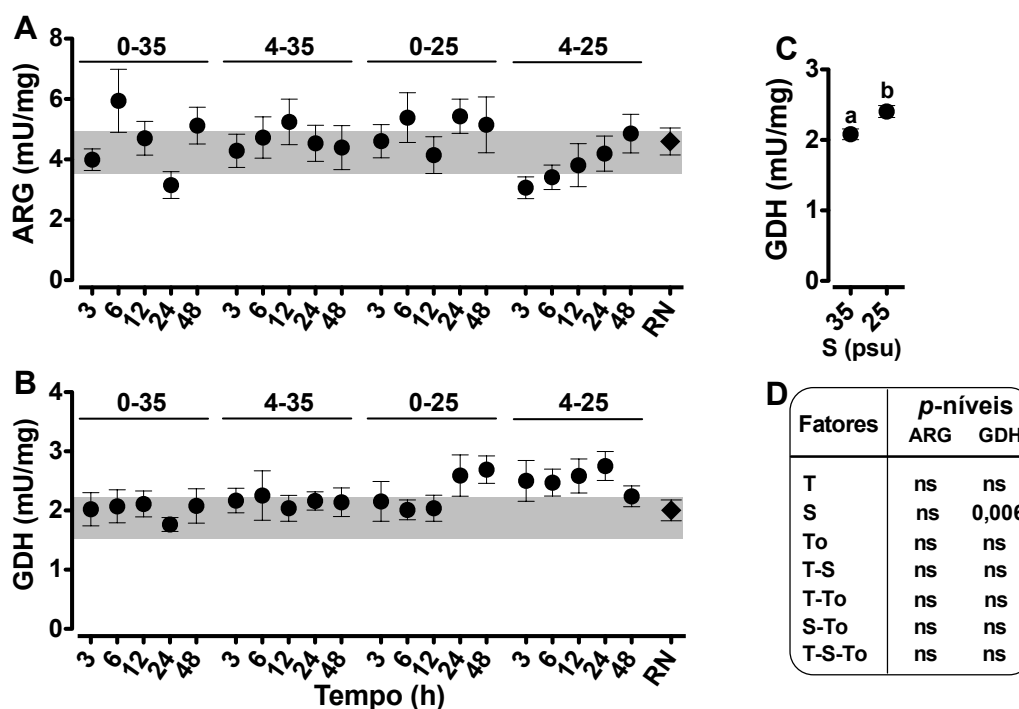


Figura 25. Efeito de temperatura (T), salinidade (S) e do tempo (To) de aclimação sobre os níveis de enzimas do metabolismo nitrogenado do pé muscular de *Nacella concinna*. Os níveis de arginase (ARG; A) e glutamato desidrogenase (GDH; B) foram acessados ao longo de 48 h, nas condições termo-salinas de 0 °C - 35 psu (0-35), 4 °C - 35 psu (4-35), 0 °C - 25 psu (0-25) e 4 °C - 25 psu (4-25). Os níveis dessas enzimas também foram determinados no pé muscular de animais imediatamente removidos da natureza (referencial da natureza; RN). As faixas cinzas, paralelas aos eixos das ordenadas, se referem ao nível das enzimas em 0 °C - 35 psu no tempo zero. O gráfico secundário C mostra o efeito da salinidade sobre os níveis de GDH. Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro D, onde ns indica não significativo. Letras diferentes acima dos níveis enzimáticos indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

4.2. Efeito de esgoto da EACF sobre o metabolismo de *Nacella concinna*

4.2.1. Defesa antioxidante

O efeito do esgoto da EACF sobre os níveis das enzimas da defesa antioxidante da glândula digestiva de *N. concinna*, estão representados na figura 26. Os níveis de G6PDH e GR não foram modulados pelo esgoto nas diluições de 0,05 e 0,5% (v/v). Apesar de os níveis de CAT se elevarem na diluição de 0,05% e 0,5% (v/v), esse aumento não foi significativo pelo teste ANOVA ($p = 0,056$). Contudo, utilizando teste t para comparar o grupo controle com o grupo esgoto completo (sem distinguir 0,05% de 0,5%), verificamos que o aumento dos níveis de CAT foi significativo para $p = 0,0166$. O esgoto elevou os níveis de SOD de forma dose-

dependente. Já os níveis de GST aumentaram significativamente somente na exposição ao esgoto na diluição de 0,05% (v/v).

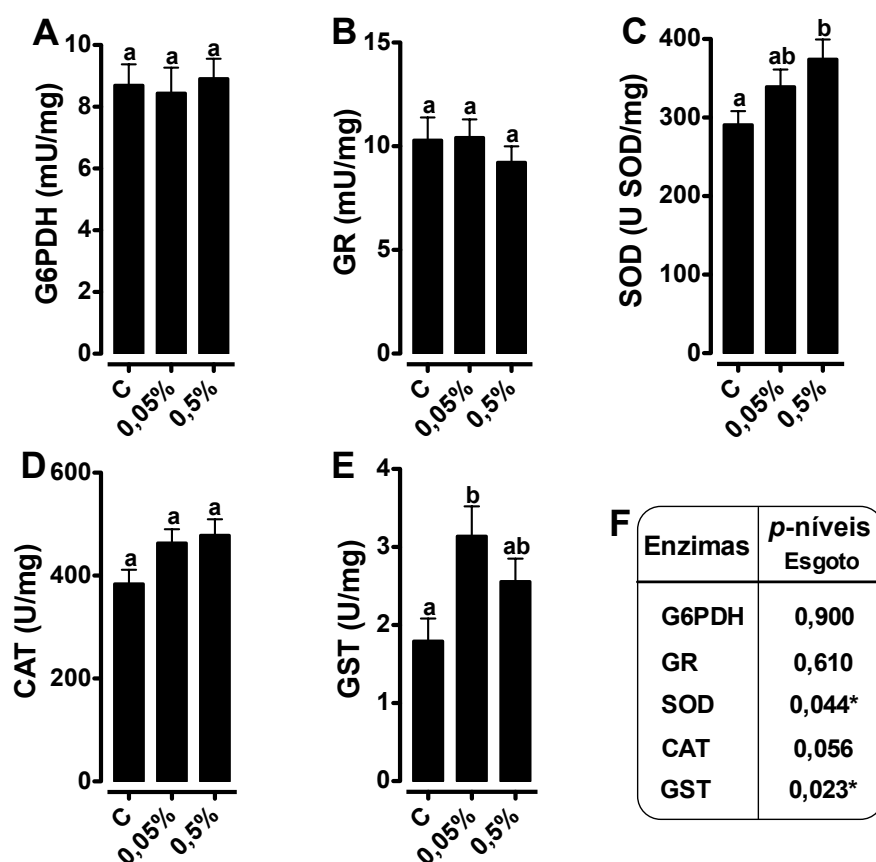


Figura 26. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os níveis das enzimas da defesa antioxidante da glândula digestiva de *Nacella concinna*. Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH; A), glutathione redutase (GR; B), superóxido dismutase (SOD; C), catalase (CAT; D) e glutathione S-transferase (GST; E). Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro F, onde asterisco (*) indica valor significativo para $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

A presença do esgoto não elevou as lesões oxidativas em lipídeos na glândula digestiva de *N. concinna*, já que não foram observadas alterações significativas nos níveis de LPO (figura 27 A). Contudo, foi observado aumento de lesões oxidativas em proteínas na diluição do esgoto 0,05% (v/v) e, posterior redução, na diluição de 0,5% (v/v) (figura 27 B).

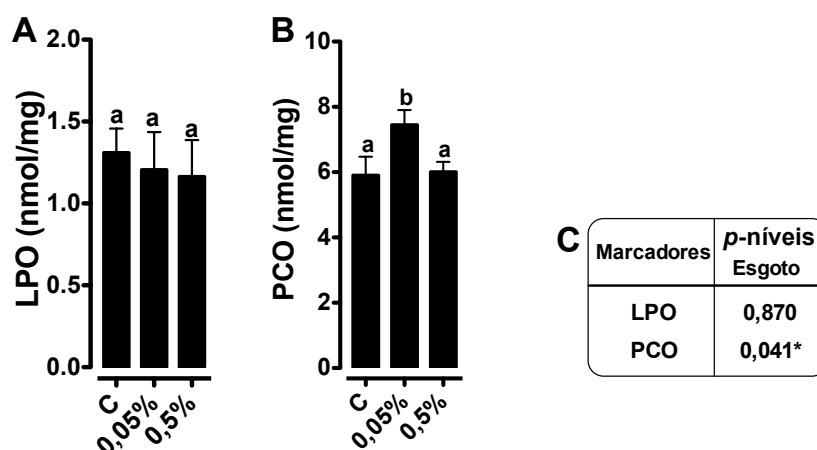


Figura 27. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os marcadores de lesão oxidativa da glândula digestiva de *Nacella concinna*. Lipoperoxidação (LPO; A) e proteínas carboniladas (PCO; B). Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro C, onde asterisco (*) indica valor significativo para $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

O efeito do esgoto da EACF sobre os níveis de enzimas da defesa antioxidante branquial de *N. concinna* pode ser visto na figura 28. Os níveis de G6PDH aumentaram na presença do esgoto 0,05 e 0,5% (v/v), sem diferença significativa entre as duas diluições. Os níveis das enzimas GR, SOD e CAT não foram modulados significativamente na presença do esgoto.

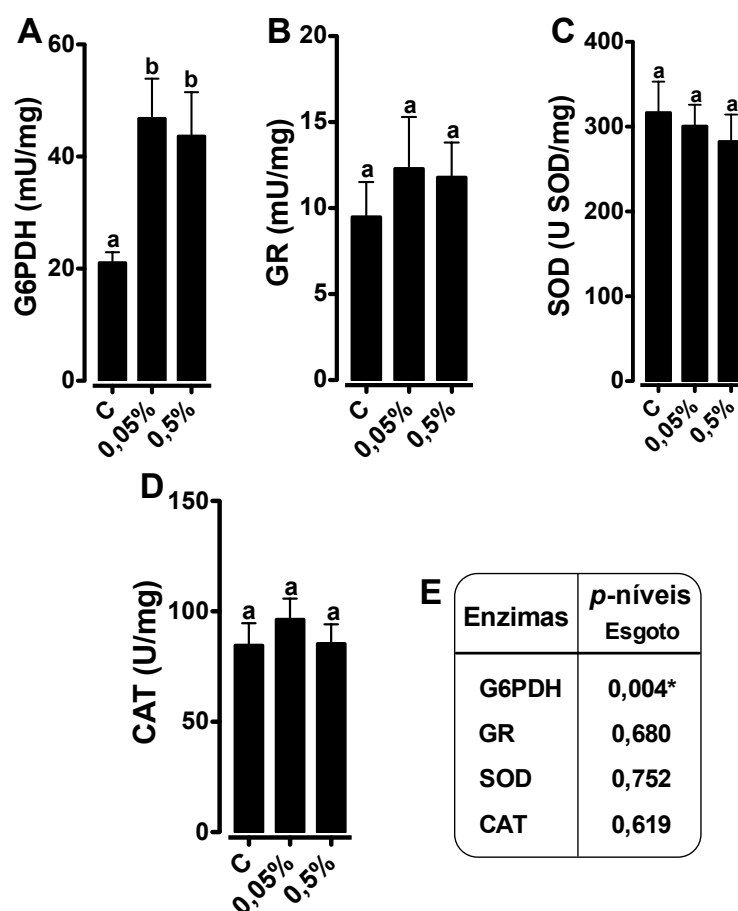


Figura 28. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os níveis das enzimas da defesa antioxidante das brânquias de *Nacella concinna*. Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH; A), glutathione redutase (GR; B), superóxido dismutase (SOD; C) e catalase (CAT; D). Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro E, onde asterisco (*) indica valor significativo para $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

O efeito do esgoto da EACF sobre os níveis de enzimas da defesa antioxidante do pé muscular de *N. concinna* pode ser visto na figura 29. A exposição ao esgoto da EACF, nas diluições 0,05 e 0,5% (v/v), não modulou os níveis das enzimas G6PDH, GR, SOD e CAT, embora um efeito dose-dependente tenha elevado levemente os níveis de SOD, e reduzido os níveis de CAT.

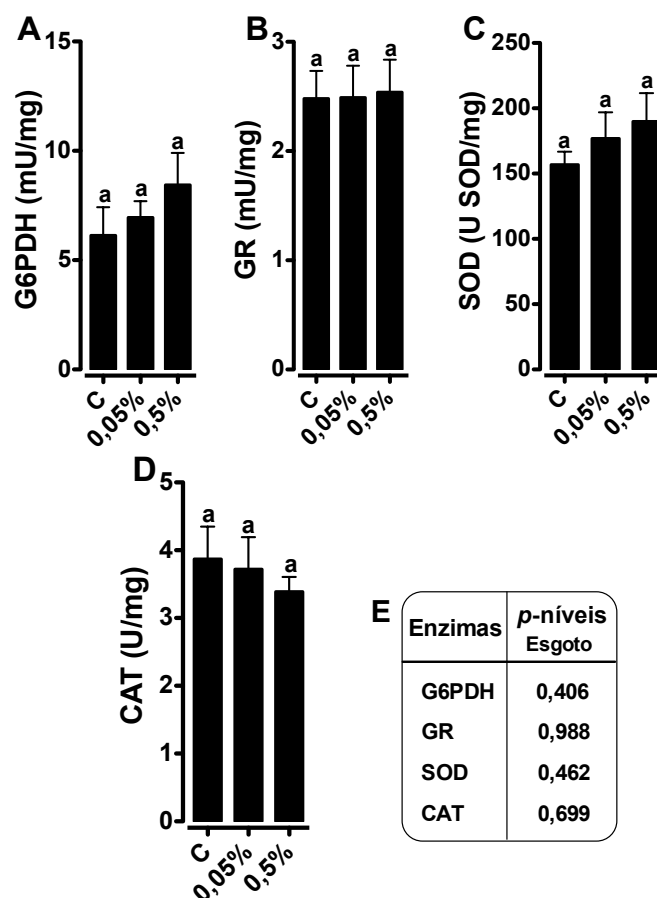


Figura 29. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os níveis das enzimas da defesa antioxidante do pé muscular de *Nacella concinna*. Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH; A), glutationa redutase (GR; B), superóxido dismutase (SOD; C) e catalase (CAT; D). Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro E, onde asterisco (*) indica valor significativo para $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

4.2.2. Metabolismo energético e nitrogenado

O efeito do esgoto da EACF sobre os níveis de enzimas do metabolismo energético anaeróbico branquial de *N. concinna*, pode ser visto na figura 30. Os níveis de HK, PFK e PK não foram modulados significativamente em nenhuma das duas diluições do esgoto. Contudo, houve um aumento dos níveis de LDH que ficaram próximos da significância em ambas diluições do esgoto ($p = 0,060$), e utilizando teste t para comparar o grupo controle com o grupo esgoto completo (sem distinguir 0,05% de 0,5%), verificamos que o aumento dos níveis de LDH foram significativos para $p = 0,0167$.

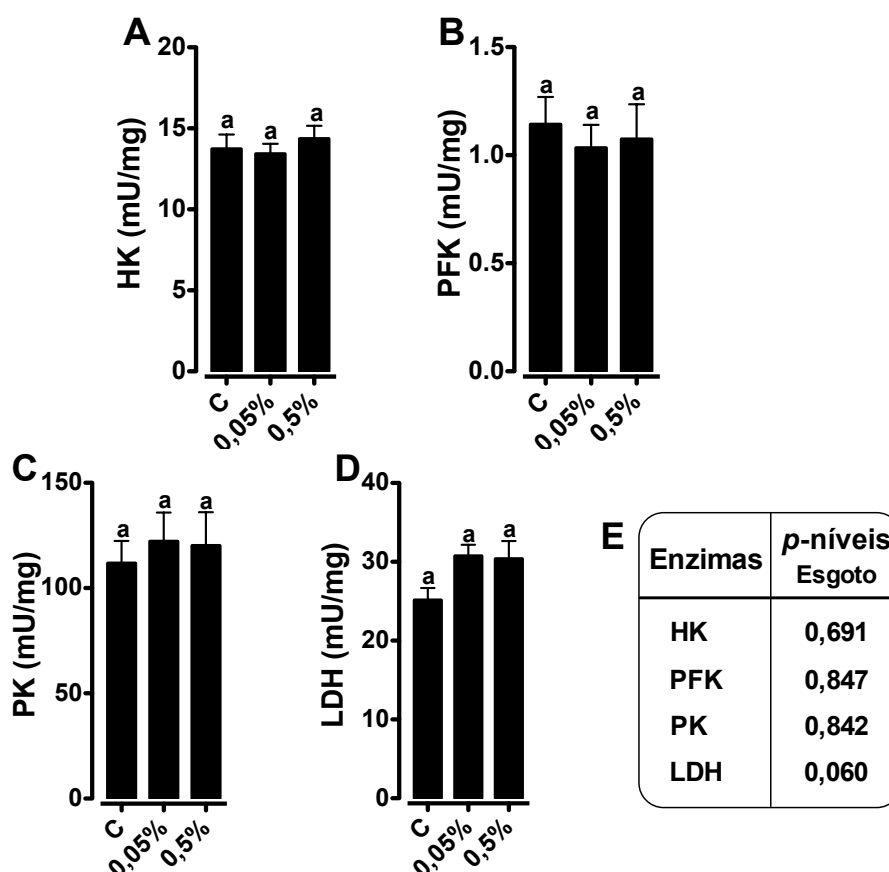


Figura 30. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os níveis das enzimas da via glicolítica das brânquias de *Nacella concinna*. Hexoquinase (HK; A), fosfofrutoquinase (PFK; B), piruvato quinase (PK; C) e lactato desidrogenase (LDH; D). Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro E, onde asterisco (*) indica valor significativo para $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

Em relação ao metabolismo aeróbio branquial, o esgoto na diluição de 0,05% (v/v) elevou os níveis de CS, diferente da diluição de 0,5% (v/v), onde os níveis de CS foram mantidos próximos do controle. Os níveis de IDH aumentaram na presença do esgoto, independentemente da sua diluição. Entretanto, não foi observada modulação significativa de MDH na exposição ao esgoto (figura 31).

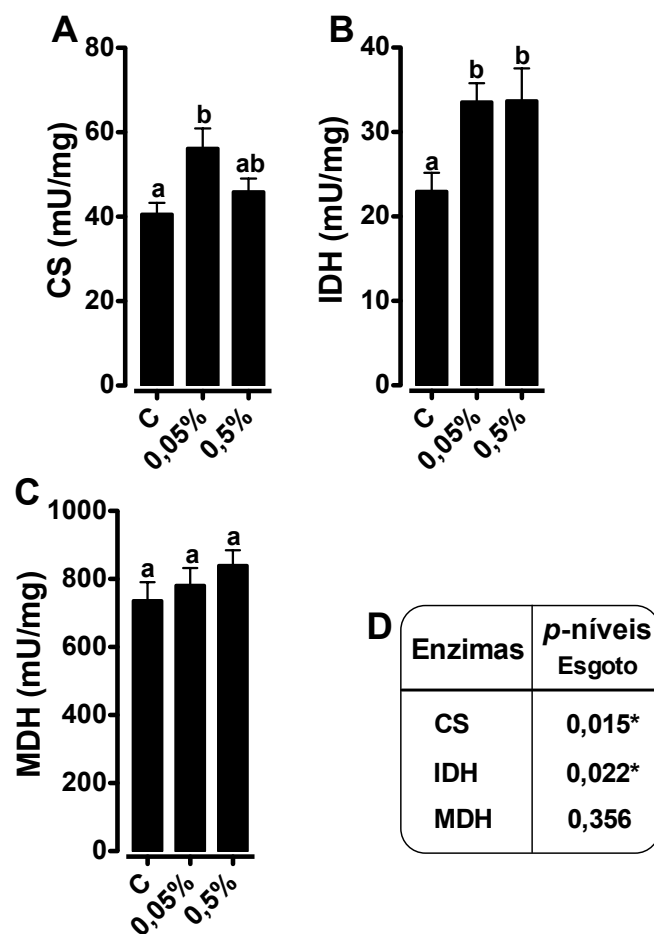


Figura 31. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os níveis das enzimas do ciclo do ácido cítrico das brânquias de *Nacella concinna*. Citrato sintase (CS; A), isocitrato desidrogenase (IDH; B) e malato desidrogenase (MDH; C). Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro D, onde asterisco (*) indica valor significativo para $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

Os níveis de GDH em brânquias ficaram abaixo do limite de detecção do método utilizado. A exposição ao esgoto da EACF foi capaz de modular o metabolismo nitrogenado branquial, onde foi possível observar uma elevação significativa de ARG em ambas as diluições de esgoto (figura 32).

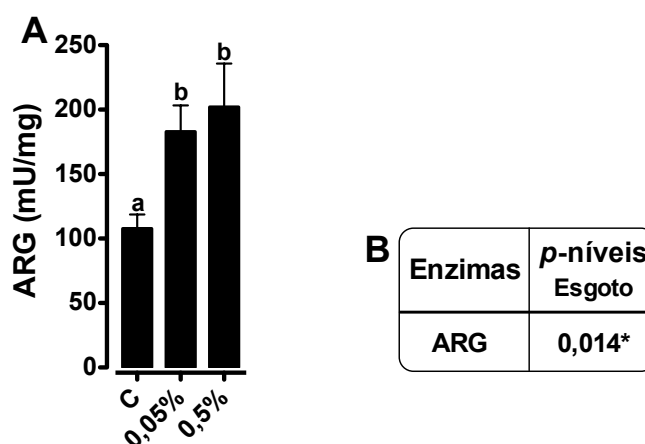


Figura 32. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os níveis de arginase (ARG; A) das brânquias de *Nacella concinna*. Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro B, onde asterisco (*) indica valor significativo para $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

O efeito do esgoto da EACF sobre os níveis de enzimas glicolíticas do pé muscular de *N. concinna*, pode ser visto na figura 33. Os níveis das enzimas SDH, ADH, PEPCK e PC ficaram abaixo do limite da detecção dos métodos. Os níveis de PFK aumentaram significativamente na presença do esgoto diluído à 0,05% (v/v), sendo que na diluição 0,5% (v/v) não houve aumento dos níveis de PFK (figura 33 B). De forma semelhante, os níveis de PK também sofreram elevação na presença do esgoto diluído à 0,05% (v/v), mas esse aumento ficou um pouco acima do limite da significância ($p = 0,058$) (figura 33 C).

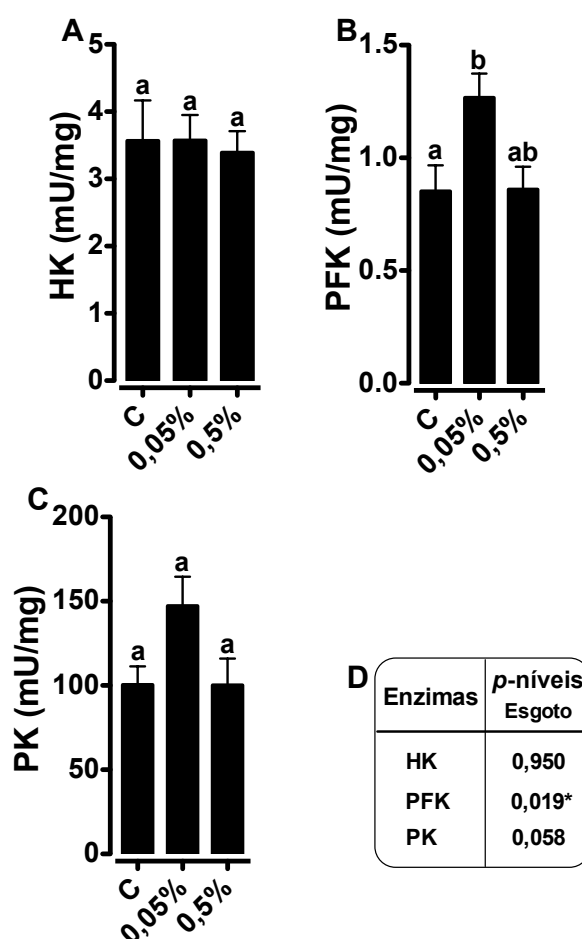


Figura 33. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os níveis das enzimas da via glicolítica do pé muscular de *Nacella concinna*. Hexoquinase (HK; A), fosfofrutoquinase (PFK; B), e piruvato quinase (PK; C). Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro D, onde asterisco (*) indica valor significativo para $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

Já os níveis das enzimas do metabolismo anaeróbico LDH, ODH, ALT e AST do pé muscular não foram modulados em nenhuma das duas condições experimentais (figura 34).

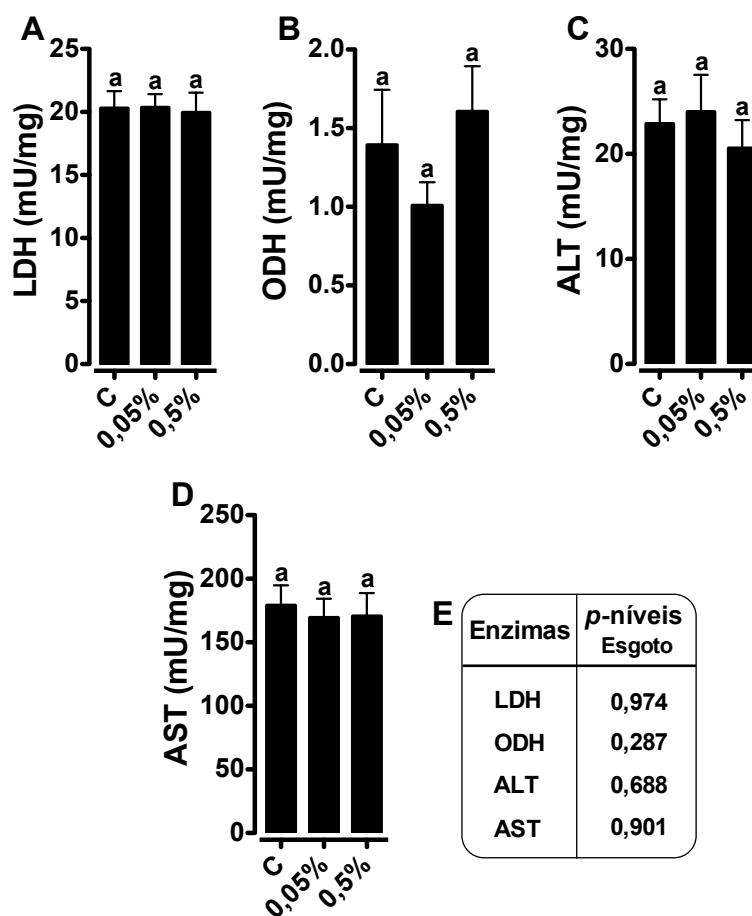


Figura 34. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os níveis das enzimas do metabolismo anaeróbico do pé muscular de *Nacella concinna*. Lactato desidrogenase (LDH; A); octopina desidrogenase (ODH; B); alanina aminotransferase (ALT; C); e aspartato aminotransferase (AST; D). Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro E, onde asterisco (*) indica valor significativo para $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

Em relação ao metabolismo aeróbico do pé muscular, a exposição de *N. concinna* ao esgoto da EACF não foi capaz de modular os níveis de CS, IDH e MDH (figura 35).

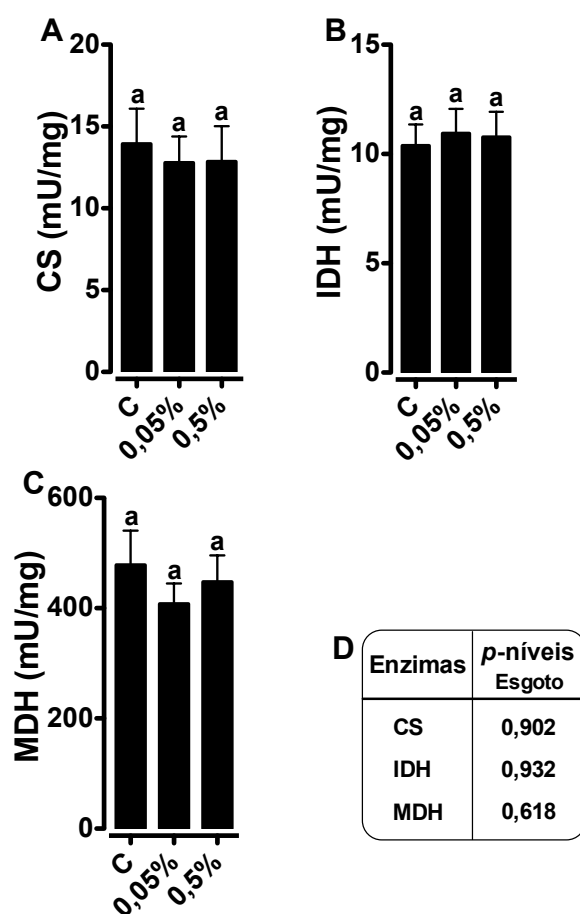


Figura 35. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os níveis das enzimas do ciclo do ácido cítrico do pé muscular de *Nacella concinna*. Citrato sintase (CS; A), isocitrato desidrogenase (IDH; B); malato desidrogenase (MDH; C) Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro D, onde asterisco (*) indica valor significativo para $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

Em relação ao metabolismo nitrogenado do pé muscular, apesar de ter sido observada uma redução dose-dependente de ARG na exposição ao esgoto, essa diminuição não foi significativa. Também não foi observada alteração significativa dos níveis de GDH (figura 36).

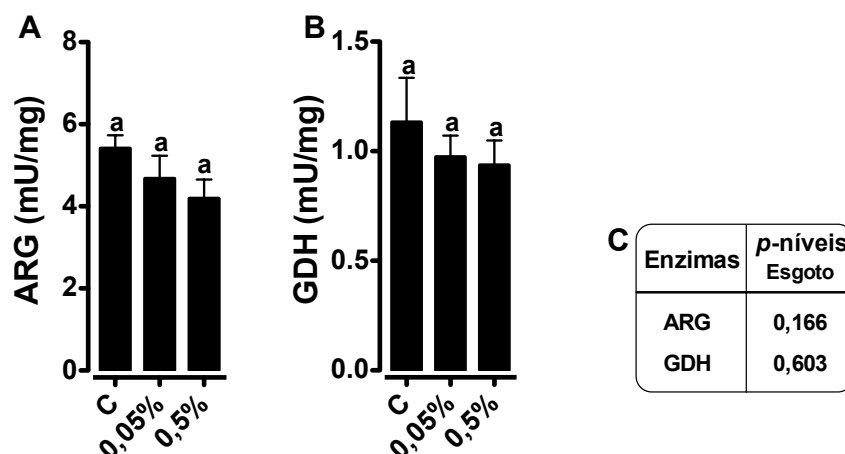


Figura 36. Efeito do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz sobre os níveis das enzimas do metabolismo nitrogenado do pé muscular de *Nacella concinna*. Arginase (ARG; A) e glutamato desidrogenase (GDH; B). Os resultados estatísticos estão sumarizados no quadro C, onde asterisco (*) indica valor significativo para $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

4.3. Caracterização das arginases de *Nacella concinna*

4.3.1. Localização tecidual e subcelular de arginases em *N. concinna*

Os níveis de ARG branquial foram 9 e 23 vezes maiores do que no pé muscular e o *pool* dos demais tecidos moles, respectivamente (figura 37 A). Cerca de 91% e 86% da atividade argininolítica foi encontrada na fração citosólica das brânquias e pé muscular de *N. concinna*, respectivamente (figura 37 B).

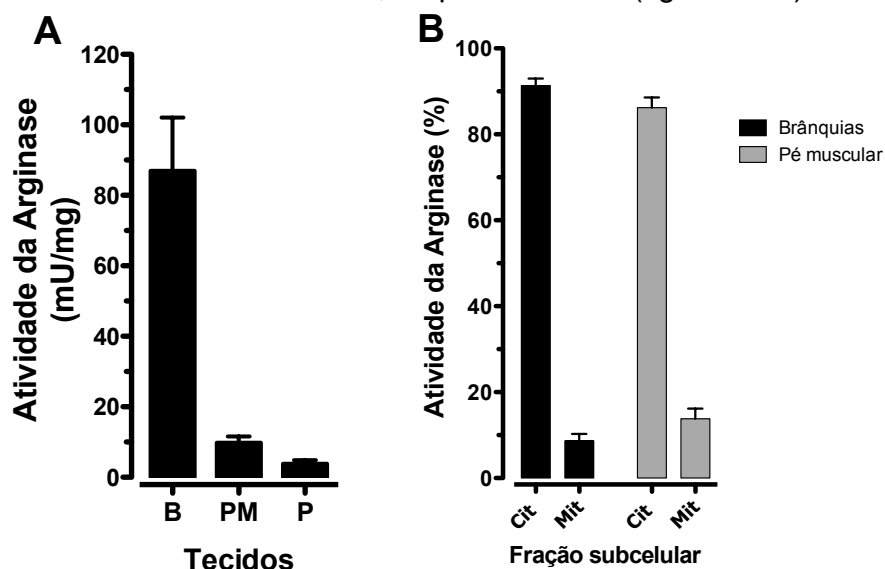


Figura 37. Distribuição tecidual e localização subcelular das arginases de *Nacella concinna*. Os níveis teciduais de arginase (A) foram determinados em brânquias (B), pé muscular (PM) e *pool* dos demais tecidos moles (P). A distribuição subcelular da atividade argininolítica (B), nas frações citosólica (Cit) e mitocondrial (Mit), das brânquias e pé muscular, foram expressas em porcentagem.

4.3.2. Saturação das arginases de *N. concinna* por L-arginina

As curvas de saturação das arginases de brânquias e pé muscular de *N. concinna* por L-arginina, podem ser vistas na figura 38. A curva de saturação da ARG branquial foi característica de enzimas hiperbólicas com apenas um sítio de ligação para L-arginina. A constante de Michaelis-Menten (K_M) para L-arginina foi $42,3 \pm 6,4 \text{ mmol.L}^{-1}$ (figura 38 A). Em concentrações acima de 80 mM a L-arginina foi capaz de inibir a atividade da ARG branquial.

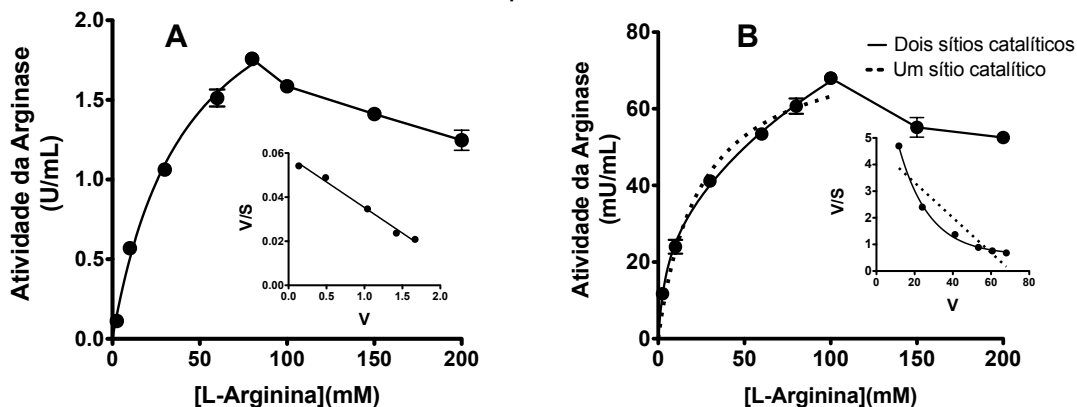


Figura 38. Curva de saturação das arginases branquial (A) e do pé muscular (B) de *Nacella concinna* por L-arginina. As curvas foram ajustadas considerando duas possibilidades: a presença de apenas um único tipo de sítio ativo (ou apenas uma isoforma de arginase) e a presença de dois ou mais sítios ativos (ou duas ou mais formas isoenzimáticas), com propriedades cinéticas distintas. Gráficos secundários (inserção) V/S versus V , foram utilizados para caracterizar a existência de múltiplas arginases com propriedades cinéticas distintas. V: velocidade; S: substrato.

A ARG do pé muscular de dois espécimes de *N. concinna* apresentaram curva de saturação característica de enzimas com dois ou mais sítios ativos para L-arginina, ou a presença de duas ou mais formas isoenzimáticas com propriedades cinéticas distintas (figura 38 B). A curva de saturação da ARG do pé muscular dos outros três espécimes de *N. concinna* foram características de enzimas hiperbólicas com apenas um sítio de ligação. Contudo, ao comparar o comportamento cinético das ARG dos pés musculares dos cinco espécimes, observamos que a razão entre os sítios de alta e baixa afinidade não foram constantes, e variaram entre >1% e 19%. O valor de $K_M = 25,3 \pm 3,4 \text{ mM}$ da ARG do pé muscular de *N. concinna* foi calculado considerando apenas os dados das curvas de saturação com razão entre sítios de alta e baixa afinidade inferior a 2%. Também ficou evidente que concentrações de L-arginina acima de 100 mM são capazes de inibir a ARG do pé muscular.

4.3.3. Efeito de cátions metálicos sobre a atividade argininolítica

O efeito de cátions metálicos sobre a atividade da ARG branquial de *N. concinna* pode ser visto na figura 39. Mn^{2+} e Cu^{2+} ativaram a ARG branquial em 75% e 25%, respectivamente, sendo que o Mn^{2+} foi o principal cátion ativador da ARG branquial e a ativação por Cu^{2+} ficou um pouco acima do limite da significância ($p=0,07$). Ni^{2+} não foi capaz de modular a atividade da ARG, sendo que Co^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{3+} inibiram a atividade argininolítica em 18%, 28% e 15%, respectivamente. Os cátions metálicos não essenciais Hg^{2+} e Cd^{2+} inibiram a ARG branquial em 76% e 79%, respectivamente, e Pb^{2+} não foi capaz de modular a atividade da enzima.

O efeito combinado de dois cátions metálicos sobre a atividade da ARG branquial foi acessado na presença de Mn^{2+} ou Cu^{2+} junto com um outro cátion metálico (figura 39). A ativação por Mn^{2+} com Cu^{2+} foi apenas 32% em relação ao controle. A inibição por Co^{2+} deixou de existir na presença de Cu^{2+} , e a atividade da ARG aumentou 58% em relação ao controle. Por outro lado, Mn^{2+} foi incapaz de ativar a ARG na presença de Co^{2+} . Os cátions Mn^{2+} e Cu^{2+} foram incapazes de ativar a ARG na presença de Ni^{2+} , Zn^{2+} ou Fe^{3+} . O Mn^{2+} não foi capaz de impedir a inibição da ARG por Hg^{2+} ou Cd^{2+} , bem como não foi capaz de ativar a ARG na presença de Pb^{2+} , que manteve atividade próxima a do controle. A ação conjunta de Cu^{2+} com Pb^{2+} resultou na inibição da ARG, embora Cu^{2+} e Pb^{2+} , isoladamente, não tenham inibido a enzima. O Cu^{2+} ativou parcialmente a ARG inibida por Cd^{2+} , dobrando a sua atividade em relação ao efeito isolado do Cd^{2+} .

Os efeitos de cátions metálicos sobre a atividade da ARG do pé muscular de *N. concinna* estão mostrados na figura 40. Os cátions Ni^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} e Cu^{2+} ativaram a ARG do pé muscular em 371%, 231%, 62% e 10%, respectivamente, em relação ao controle. Zn^{2+} e Fe^{3+} não foram capazes de modular a atividade argininolítica. Os cátions metálicos não fisiológicos, Hg^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} inibiram a atividade da ARG em 44%, 33% e 40%, respectivamente.

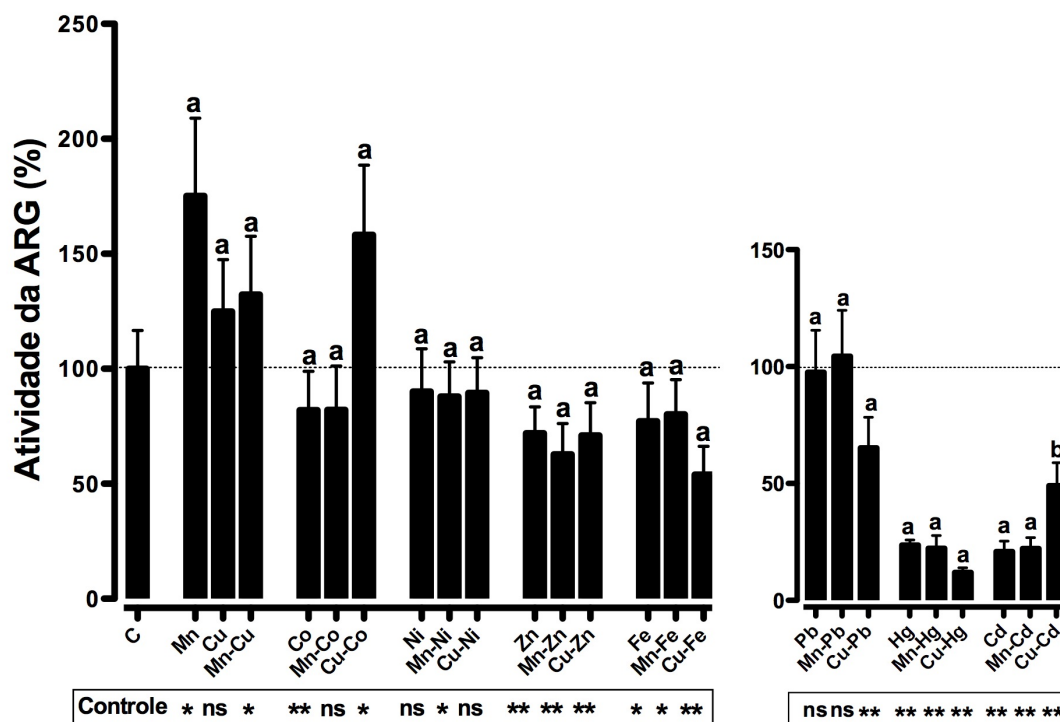


Figura 39. Efeito de cátions metálicos sobre a atividade da arginase branquial de *Nacella concinna*. As atividades foram relativizadas em função do controle (C) e expressas em porcentagem. Os valores representam a média \pm EPM (erro padrão da média) de cinco espécimes. As letras acima das barras indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ dentro do mesmo grupo de metais. Os símbolos abaixo das barras representam a comparação estatística entre cada tratamento e o controle (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns – não significativo).

O efeito combinado de dois cátions metálicos sobre a atividade da ARG do pé muscular foi acessado na presença de Mn^{2+} ou Cu^{2+} junto com um outro cátion metálico. A ARG do pé muscular foi ativada em 212% na presença de Mn^{2+} com Cu^{2+} , semelhante a ativação produzida apenas por Mn^{2+} . A ativação da ARG por Mn^{2+} com Co^{2+} foi de 97%, sendo apenas 12% maior do que a ativação promovida por Co^{2+} . O Mn^{2+} não foi capaz de alterar a atividade da ARG na presença de Zn^{2+} , mas ativou em 108% a ARG na presença de Fe^{3+} . A ARG foi ativada em 376% por Cu^{2+} com Co^{2+} , bem acima da ativação promovida por Co^{2+} ou Cu^{2+} isoladamente. Por outro lado, Cu^{2+} com Ni^{2+} ativou a ARG em 27%, semelhante a ativação promovida apenas por Cu^{2+} , e expressivamente menor do que a ativação promovida por Ni^{2+} . A atividade da ARG na presença de Cu^{2+} com Fe^{3+} foi 54% menor do que a atividade verificada só com Fe^{3+} . O Pb^{2+} deixou de inibir a ARG na presença de Mn^{2+} e a ARG foi ativada em 132%, comparado ao controle. O Mn^{2+} não foi capaz de evitar a inibição por Hg^{2+} e Cd^{2+} , prevalecendo o efeito inibidor desses dois cátions não fisiológicos. Cu^{2+} impediu a inibição por Cd^{2+} , mas não foi capaz de impedir a inibição por Pb^{2+} e Hg^{2+} (figura 40).

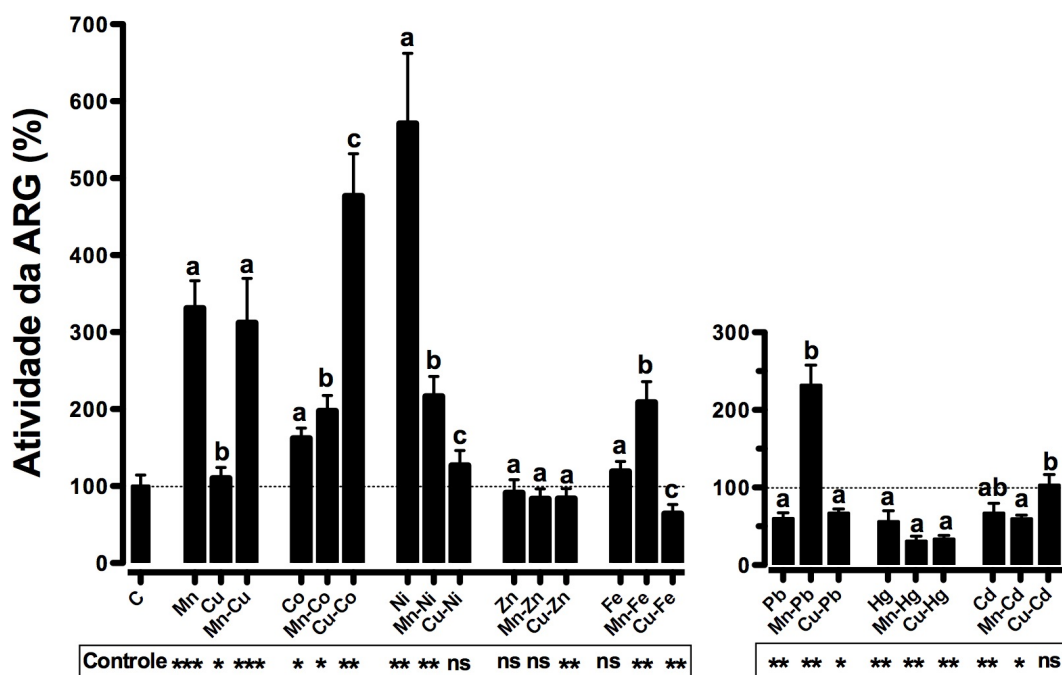


Figura 40. Efeito de cátions metálicos sobre a atividade da arginase do pé muscular de *Nacella concinna*. As atividades foram relativizadas em função do controle (C) e expressas em porcentagem. Os valores representam a média \pm EPM (erro padrão da média) de cinco espécimes. As letras acima das barras indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ dentro do mesmo grupo de metais. Os símbolos abaixo das barras representam a comparação estatística entre cada tratamento e o controle (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns – não significativo).

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeito de temperatura e salinidade ao longo do tempo

Dentre os fatores abióticos ambientais, a temperatura e a salinidade apresentam forte influência sobre os processos fisiológico, considerando que ambos, isoladamente ou com interações, têm a capacidade de induzir o estresse oxidativo, elevar a toxicidade de vários compostos químicos (como metais por exemplo), alterar a taxa de crescimento, aumentar a demanda energética para a manutenção de processos metabólicos cruciais para a manutenção da homeostasia (HALL & ANDERSON, 1995; GUERIN & STICKLE, 1997; PÖRTNER *et al.*, 1999a; HEUGENS *et al.*, 2001; HEISE *et al.*, 2003; AN & CHOI, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2013; VINAGRE *et al.*, 2014; BASHEVKIN & PECHENIK, 2015; CANESI, 2015), além de induzir alterações comportamentais cruciais para a sobrevivência, como a resposta ao odor de alimento e capacidade de locomoção (JANECKI *et al.*, 2010) em uma série de organismos. Somado a isso, a temperatura pode alterar as funções biológicas, acelerando ou diminuindo a velocidade das reações químicas (PECK, 2016). Dessa forma, a compreensão das adaptações metabólicas que permitem *N. concinna* sobreviver às flutuações diárias de temperatura e salinidade naturalmente vivenciadas por esse molusco em seu habitat, é de extrema importância, especialmente no contexto das adaptações peculiares apresentadas pelos organismos endêmicos da Antártica, que apresentam uma história evolutiva única.

5.1.1. Defesa antioxidante

A baixa salinidade elevou o potencial gerador de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ das brânquias e glândula digestiva de *N. concinna*. Embora os níveis de GR não tenham sido modulados na baixa salinidade (figura 41), o papel central da glutathione reduzida na homeostasia celular, envolve um número elevado de reações redox, e é responsável pela manutenção da integridade de organelas celulares e proteínas na sua forma nativa (CIRCU & AW, 2010). Nesse sentido, o aumento dos níveis de G6PDH no estresse hipossalino, sinaliza o esforço de manutenção da homeostasia redox das brânquias e glândula digestiva de *N. concinna*. Assim, os níveis elevados de G6PDH podem ter papel central na defesa antioxidante NADPH-dependente de *N. concinna*, promovendo efeito protetor contra estresse oxidativo.

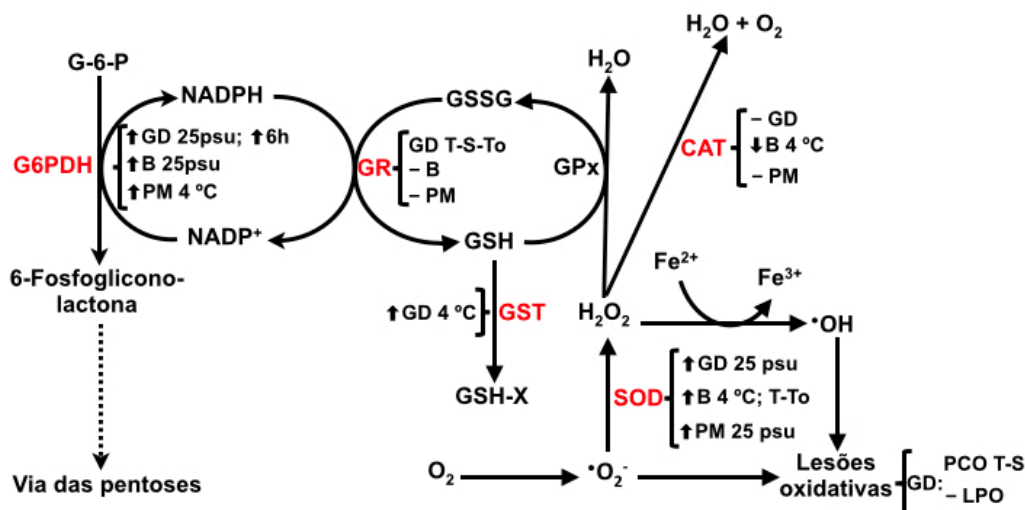


Figura 41. Defesa antioxidante de *Nacella concinna* durante o estresse térmico e hipossalino. As enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH); glutathiona redutase (GR); glutathiona S-transferase (GST); superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), foram utilizada no presente estudo (em vermelho) como marcadores da defesa antioxidante. Os resultados estão indicados em colchetes à frente das siglas das enzimas. Os efeitos dos fatores sobre os níveis enzimáticos da glândula digestiva (GD), brânquias (B) e pé muscular (PM) estão indicadas por setas (↑, aumento ou ↓, redução) e traços (-), sinalizando ausência de modulação, na temperatura de 4 °C e salinidade de 25 psu. As interações termo-salina (T-S), temperatura-tempo (T-To) e temperatura-salinidade-tempo (T-S-To) estão indicadas na figura. O efeito do tempo está indicado numericamente em horas. Setas pontilhadas indicam reações omitidas no esquema. GPx: glutathiona peroxidase; PCO: carbonilação de proteínas; LPO: peroxidação lipídica; GSH: glutathiona reduzida; GSSG: glutathiona oxidada.

O potencial dismutador de superóxido do pé muscular e glândula digestiva de *N. concinna*, também foram modulados positivamente na hipossalinidade. A baixa salinidade tem sido descrita como uma condição fisiológica ambiental capaz de induzir alterações pro-oxidantes em organismos da zona entremarés. Nesse caso, o mecanismo de geração de ROS não está claro, mas pode ter relação com a produção de óxido nítrico (*NO), induzida pela condição hipossalina (RIVERA-INGRAHAM *et al.*, 2016). Assim, a elevação dos níveis de SOD no pé muscular e glândula digestiva de *N. concinna*, sugere um aumento da demanda antioxidante.

A condição antioxidante em que um organismo encontra-se fornece informações críticas sobre a sua capacidade de resistir ao estresse ambiental (COMOGLIO *et al.*, 2011). Estressores ambientais são conhecidos por induzir alterações no balanço redox celular e estresse oxidativo (FRANCO *et al.*, 2009), que é definido como um distúrbio no balanço entre produção de espécies reativas de oxigênio e a defesa antioxidante (BETTERIDGE, 2000).

Apesar de desempenharem papel fundamental como sinalizadores intracelulares, quando em excesso, as espécies reativas de oxigênio podem ser lesivas, induzindo danos em lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, o que pode resultar em morte celular e danos teciduais (FRANCO *et al.*, 2009; BRACONI *et al.*, 2011). Dessa forma, as enzimas participantes da defesa antioxidante exercem papel fundamental na proteção das estruturas celulares.

Semelhante ao observado no presente estudo, Feijó de Oliveira e colaboradores (2015) verificaram modulação positiva dos níveis de G6PDH branquial e SOD do pé muscular em *N. concinna* após a exposição dos patelídeos à 25 psu por 8 dias. Os autores também observaram que, na exposição à hipossalinidade, a glândula digestiva não modulou os níveis das enzimas da defesa antioxidante, enquanto as brânquias elevaram os níveis de SOD, e o pé muscular elevou os níveis de G6PDH. A indução de SOD e G6PDH de brânquias e pé muscular após 8 dias em estresse hipossalino, bem como G6PDH nas brânquias e SOD no pé muscular após 48 horas, mostraram que esses dois tecidos são capazes de elevar a defesa antioxidante de *N. concinna* no estresse hipossalino no curto e médio prazo. Assim, os nossos resultados sugerem que a defesa antioxidante de *N. concinna* está bem dimensionada para suportar o estresse hipossalino imposto pelos ciclos de marés, os quais têm duração de poucas horas.

Os resultados do presente estudo mostraram que não houve alteração dos marcadores de lesão oxidativa em lipídeos (LPO) e proteínas (PCO) na glândula digestiva de *N. concinna*. Contudo, Feijó de Oliveira e colaboradores (2015) observaram níveis elevados de LPO em glândula digestiva de *N. concinna*, na exposição à 25 psu por 8 dias. No presente estudo, os níveis de LPO da glândula digestiva não sofreram alterações no curto prazo, mostrando que a defesa antioxidante da glândula digestiva de *N. concinna* é capaz de evitar lesões oxidativas de curto prazo, porém incapaz de evitar lesões oxidativas no médio prazo.

A limitação da capacidade antioxidante da glândula digestiva no estresse hipossalino de médio prazo, fica evidente quando analisamos a elevação dos níveis de G6PDH ao longo do tempo. O nível máximo de atividade ocorreu no tempo de 6 h e, subsequentemente, sofreu redução até retornar aos níveis do controle no tempo de 48 h. A limitação da glândula digestiva de *N. concinna* sustentar níveis elevados de enzimas da defesa antioxidante no estresse hipossalino de médio prazo, ficou

evidente no estudo conduzido por Feijó de Oliveira *et al.* (2015), mostrando que os níveis de SOD não foram modulados após 8 dias nessa condição de estresse.

Quanto à carbonilação de proteínas, enquanto no presente estudo foi observada uma interação termo-salina capaz de modular negativamente os níveis de PCO em 4-25, no estudo conduzido por Feijó de Oliveira *et al.* (2015), foi observada redução desse marcador de lesão oxidativa em proteínas tanto no aquecimento em 4 °C, quanto na hipossalinidade em 25 psu. Os autores postularam que essa redução pode ser decorrente da rápida digestão proteolítica ao qual proteínas oxidadas estão sujeitas, como um mecanismo de defesa para evitar a formação de agregados proteicos potencialmente lesivos para a célula. Já foi reportado que em organismos habitantes de regiões polares, as proteínas são menos estáveis, pois esses organismos evoluíram sob a pressão seletiva de temperaturas baixas e estáveis (TSAI *et al.*, 2002; GRAZIANO, 2014; PECK, 2016), ocorrendo maior índice de degradação proteica em peixes via ubiquitinação (SHIN *et al.*, 2012; PECK, 2016).

Dessa forma, observando os resultados de ambos os estudos, aparentemente a modulação inicial dos níveis de PCO ocorre pela interação entre o aquecimento e a baixa salinidade. No médio prazo (8 dias), a interação entre os fatores deixa de existir, e o aquecimento e hipossalinidade isoladamente, passam a exercer efeito modulador negativo sobre os níveis de carbonilação proteica, possivelmente como um mecanismo protetor.

Em relação ao efeito da temperatura nas brânquias, o aquecimento em 4 °C foi capaz de elevar os níveis de SOD, contudo CAT apresentou redução nessa mesma condição. Considerando que a SOD dismuta o superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que posteriormente pode ser decomposto na reação catalisada pela CAT, o aumento de SOD sem aumento de CAT sugere que: a) a CAT está em nível suficientemente elevado para decompor a maior quantidade de H_2O_2 formado pelos níveis elevados de SOD ou b) o H_2O_2 formado pela SOD está sendo decomposto por outra via, possivelmente pela glutathione peroxidase (GPx), não analisada no presente estudo.

O pé muscular de *N. concinna*, modulou positivamente os níveis de G6PDH no aquecimento em 4 °C, elevando o potencial gerador de $NADPH+H^+$ desse tecido. O aquecimento também modulou positivamente os níveis de HK, elevando a

capacidade de fosforilar glicose e disponibilizar glicose-6-fosfato para via glicolítica e via das pentoses-fosfato.

Na glândula digestiva, o aquecimento em 4 °C elevou os níveis de GST. Essa enzima integra a fase II do metabolismo de xenobióticos, conjugando GSH a xenobióticos e endobióticos (como aldeídos intracelulares derivados da peroxidação de DNA e lipídeos), os quais são potencialmente lesivos para células e tecidos (FERREIRA *et al.*, 2007; VALKO *et al.*, 2007; BORKOVIC *et al.*, 2008; HELLOU *et al.*, 2012). Dessa forma, o aumento de GST na glândula digestiva indica uma resposta antioxidante protetora.

Trabalhando com *N. concinna*, Abele e colaboradores (1998), constataram que o aquecimento em 4 °C por 24 e 48 h, foi capaz de elevar os níveis de SOD nas brânquias desse gastrópode, semelhante ao descrito no presente estudo. Contudo, diferentemente do presente estudo, onde verificou-se uma redução de CAT branquial, e nenhuma alteração de SOD na glândula digestiva, Abele *et al.* (1998) constataram um aumento de CAT branquial e SOD glandular na exposição à 4 °C. Os autores também observaram uma redução de GPx branquial em 4 °C. Entretanto, a comparação dos resultados obtidos em ambos os trabalhos deve ser conduzida com cautela, tendo em vista as diferenças metodológicas.

Enquanto Abele *et al.* (1998) conduziram os bioensaios com animais do sublitoral (coletados entre 5 e 7 metros de profundidade) e alimentados, os espécimes do presente estudo foram coletados na zona entremarés e mantidos sem alimentação no decorrer de todo o experimento. Considerando que já foram reportadas diferenças nas respostas metabólicas entre animais do sublitoral e da zona entremarés (WEIHE, 2009; WEIHE *et al.*, 2010; GONZÁLEZ & PUNTARULO, 2016), e que as respostas enzimáticas da defesa antioxidante também são influenciadas pelo estado alimentar de *N. concinna* (ABELE *et al.*, 1998; ANSALDO *et al.*, 2007), as diferenças observadas nos resultados podem ser em decorrência das divergências experimentais entre os estudos.

O aumento de SOD e redução de CAT nas brânquias, bem como aumento de GST na glândula digestiva de *N. concinna*, também foram constatados por Feijó de Oliveira *et al.* (2015) após 8 dias de exposição desse patelídeo ao aquecimento em 4 °C. Contudo, os mesmos autores também observaram uma redução de G6PDH branquial, e aumento de SOD na glândula digestiva e pé muscular no

aquecimento, que não foi observada no presente estudo, sugerindo que a redução dos níveis de G6PDH branquial e aumento de SOD no pé muscular e glândula digestiva, no aquecimento em 4 °C, é tempo dependente, e ocorre após 48 h de exposição.

Os resultados do presente estudo mostram ainda que a glândula digestiva apresenta níveis de catalase cerca de cinco e sessenta vezes maiores do que as brânquias e pé muscular, respectivamente, nos gastrópodes do referencial da natureza, bem como nos espécimes da condição experimental 0-35-0h (animais dissecados após aclimação de três dias, antes de iniciar a variação termo-salina). Esses elevados níveis de catalase na glândula digestiva podem estar relacionados com as altas concentrações de metais encontradas nesse tecido em *N. concinna*, onde os níveis de ferro e cobre variam entre uma e duas ordens de grandeza acima de pé muscular e gônadas (AHN *et al.*, 2002). Tendo em vista que ferro e cobre são capazes de acelerar a cisão homolítica do H₂O₂ em radical hidroxil, via reação de Fenton, os níveis elevados de catalase sugerem que a glândula digestiva apresenta alto potencial para decompor o H₂O₂ e, dessa forma, minimizar a formação de radical hidroxil, bem como o seu efeito deletério sobre estruturas celulares.

Dentre as enzimas analisadas, aparentemente SOD e G6PDH são as mais sensíveis à modulação durante o estresse térmico e hipossalino nos tecidos analisados de *N. concinna*. Contudo, os níveis de pé muscular, brânquias e glândula digestiva foram modulados distintamente, mostrando que a expressão gênica dessas enzimas pode ter relação com necessidades teciduais específicas, de acordo com a função que exercem, além de poder estar relacionado com a via de exposição ao estresse.

Enquanto brânquias e pé muscular estão diretamente em contato com água ao seu redor, a glândula digestiva, é banhada pela hemolinfa, que possivelmente é suscetível às alterações de osmolaridade induzidas pelo estresse salino. Além disso, o tecido branquial exerce papel nas trocas gasosas e de íons com o ambiente externo e, portanto, é bastante susceptível às alterações físico-químicas do ambiente ao seu redor. Já o pé muscular desempenha papel fundamental de adesão ao substrato e de locomoção. O processamento de alimentos, destoxificação de xenobióticos e a egestão de excrementos, integram as funções da glândula digestiva (LIVINGSTONE, 1991; HELLER, 2015).

Respostas tecido-específicas a diversos tipos de estresse já foram reportadas em outros invertebrados, como na hipóxia do bivalve *Arctica islandica* (STRAHL *et al.*, 2011); no estresse térmico e hipóxia do gastrópode *Haliotis diversicolor* (LU *et al.*, 2016); na alteração sazonal da defesa antioxidante e lesões oxidativas do bivalve *Perna viridis*, envolvendo de forma distinta brânquias e glândula digestiva (VERLECAR *et al.*, 2008); no estresse salino dos caranguejos *Macrophthalmus japonicas* (NIKAPITIYA *et al.*, 2014) e *Scylla serrate* (PAITAL & CHAINY, 2010).

Comparativamente, os níveis de G6PDH do pé muscular do referencial da natureza foram expressivamente maiores do que os da condição termo-salina 0 °C – 35 psu, no tempo zero ($p=0,0006$). Isso mostram que o potencial gerador de $\text{NADPH}+\text{H}^+$ necessário para atender a homeostasia redox do pé muscular desse gastrópode, no seu ambiente natural, é bem maior do que na condição experimental 0 °C – 35 psu. Por outro lado, os níveis de G6PDH dos animais da natureza (23 mU/mg de proteínas) estão mais próximos dos espécimes da condição termo-salina 4-25 em 3 horas (24 mU/mg de proteínas). Considerando que os animais do referencial da natureza foram coletados durante a baixa mar, e possivelmente estavam expostos a uma condição termo-salina próxima de 4-25, esses resultados sugerem que a modulação dos níveis de G6PDH é importante para atender as necessidades fisiológicas do pé muscular durante a exposição de *N. concinna* ao estresse termo-salino imposto pelo ciclo das marés.

5.1.2. Metabolismo energético e nitrogenado

O metabolismo energético desempenha papel fundamental na manutenção de processos fisiológicos, como reprodução, crescimento, locomoção, entre outros. Diversos fatores podem alterar o metabolismo energético acelerando-o, quando há aumento da demanda de ATP, ou reduzindo-o, para poupar a energia dos estoques teciduais. Nesse sentido, o balanço energético exerce papel fundamental na tolerância e adaptação ao estresse (SOKOLOVA *et al.*, 2012).

O metabolismo energético anaeróbio muscular utiliza fosfágenos como uma reserva energética de pronto uso (GRIESHABER *et al.*, 1994; KINSEY *et al.*, 2007), sendo a fosfo-L-arginina o principal fosfágeno de moluscos (HIRD, 1986; GRIESHABER *et al.*, 1994). Por outro lado, o deslocamento da reação no sentido de

formação de ATP a partir da fosfo-L-arginina, demanda a redução dos níveis do aminoácido L-arginina, o que geralmente ocorre via conjugação do piruvato com L-arginina formando octopina, em reação catalisada pela ODH (PÖRTNER, 2002). Todavia, Pörtner e colaboradores (1999b) observaram que na recuperação do estresse térmico, o pé muscular de *N. concinna* não acumula octopina, mostrando que essa via não deve ser fisiologicamente operacional. Os baixos níveis de ODH do pé muscular de *N. concinna*, descritos no presente estudo, mostram que o pé muscular desse gastrópode tem baixa potencialidade para remover L-arginina via síntese de octopina.

Uma característica importante de várias espécies de moluscos e anelídeos é a presença tanto de LDH quanto de opinas desidrogenases no mesmo tecido (GRIESHABER *et al.*, 1994). A presença de níveis de SDH e ADH abaixo dos limites de detecção, mostrou que o metabolismo anaeróbico do pé muscular de *N. concinna* não opera essas duas vias redutoras. Porém, ficou evidente que o metabolismo anaeróbico do pé muscular desse gastrópode pode utilizar as reações catalisadas pela ODH e LDH, reduzindo o piruvato a octopina e lactato, respectivamente. Os níveis de LDH, 10 vezes superiores aos de ODH nos animais do referencial da natureza, sugerem que o pé muscular de *N. concinna* deve reduzir, preferencialmente, o piruvato à lactato, em detrimento da formação de octopina. Adicionalmente, a incapacidade de acumular octopina no estresse térmico em 4 °C, também sugere que a via de síntese de octopina não é operacional no pé muscular de *N. concinna* (PÖRTNER *et al.*, 1999b).

Considerando que a reação catalisada pela ODH, aparentemente, não é a principal via responsável pela remoção de L-arginina do pé muscular de *N. concinna*, Rodrigues e colaboradores (2011) sugeriram que a reação catalisada pela ARG do pé muscular, deve ser a principal responsável pela remoção da L-arginina do pé muscular no estresse térmico em *N. concinna*, favorecendo assim, o deslocamento da reação do “tampão energético” fosfo-L-arginina no sentido de formação de ATP. A presença de ARG em níveis duas vezes maiores que ODH (figura 42), em animais do grupo referencial da natureza, mostrou que, potencialmente, a ARG pode ser a enzima chave controladora dos níveis de L-arginina do pé muscular de *N. concinna*.

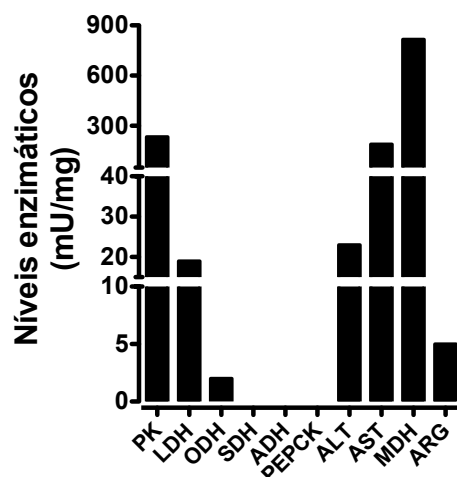


Figura 42. Níveis de enzimas do metabolismo energético anaeróbio e nitrogenado do pé muscular de *Nacella concinna* do referencial da natureza, determinados no presente estudo. PK: piruvato quinase; LDH: lactato desidrogenase; ODH: octopina desidrogenase; SDH: estrombina desidrogenase; ADH: alanopina desidrogenase; PEPCK; fosfoenolpiruvato carboxiquinase; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; MDH: malato desidrogenase; ARG: arginase.

O metabolismo anaeróbio é de extrema importância para a manutenção do status energético celular e tecidual dos organismos, decorrentes da redução ambiental do oxigênio (anaerobiose ambiental) ou devido ao aumento da demanda energética do organismo (anaerobiose funcional), permitindo a continuidade de processos vitais até a restauração da oxigenação adequada (GRIESHABER *et al.*, 1994).

Enquanto o metabolismo anaeróbio de vertebrados é sustentado basicamente pela redução do piruvato em lactato, no metabolismo anaeróbio de invertebrados operam basicamente quatro vias prioritárias de reoxidação do $\text{NADH} + \text{H}^+$: a) glicose-lactato, onde o piruvato formado na via glicolítica é oxidado à lactato, em reação catalisada pela LDH; b) glicose-opinas, onde o piruvato é conjugado à aminoácidos para formar opinas, em reações catalisadas por diversas opinas desidrogenases; c) glicose-succinato, onde o fosfoenolpiruvato formado na via glicolítica é carboxilado a oxaloacetato pela PEPCK e, posteriormente, convertido em malato no citosol, o qual pode ser transportado para a mitocôndria e ser convertido em fumarato, acetato, propionato ou succinato; d) aspartato-succinato, onde o oxaloacetato, formado na transferência do grupo amino do aspartato para o α -cetoglutarato, em reação catalisada pela AST, é convertido em malato pela MDH e posteriormente convertido em fumarato, acetato, propionato ou succinato

(GRIESHABER *et al.*, 1994; HARCET *et al.*, 2013). Adicionalmente, também pode ocorrer a transaminação do piruvato em alanina, em reação catalisada pela ALT.

Os níveis de PEPCK no pé muscular de *N. concinna*, abaixo do limite da detecção, sugerem que a via glicose-succinato não é operacional nesse tecido. Por outro lado, o metabolismo energético de *N. concinna*, o qual é baseado em proteínas (FRASER *et al.*, 2002), depende de aminotransferases para disponibilizar as cadeias carbônicas de aminoácidos para o metabolismo energético. Os níveis relativamente elevados de ALT, equivalentes aos níveis de LDH, mostram que o pé muscular desse gastrópode apresenta elevado potencial para utilizar o aminoácido alanina como substrato do metabolismo anaeróbio. Considerando que no referencial da natureza os níveis de AST são cerca de 8 e 10 vezes maiores do que os níveis de ALT e LDH, respectivamente, bem como os níveis de MDH são cerca de 35 e 43 vezes superiores aos níveis de ALT e LDH, respectivamente, fica evidente que a via aspartato-succinato pode ser importante para o metabolismo anaeróbio no pé muscular de *N. concinna*. Nesse sentido, o acúmulo de acetato e succinato superior aos níveis de lactato no pé muscular de *N. concinna* durante a exposição aérea (WEIHE & ABELE, 2008), também corrobora com essa hipótese.

A salinidade é um dos fatores abióticos ambientais mais importantes para animais aquáticos. As alterações de salinidade demandam ativações de mecanismos adaptativos capazes de manter as atividades fisiológicas dos organismos (MURAEVA *et al.*, 2016). Enquanto organismos osmorreguladores geralmente utilizam o transporte de íons, osmoconformista geralmente utilizam moléculas orgânicas para a regulação da pressão osmótica intracelular (YANCEY, 2005). Acredita-se que o uso de moléculas orgânicas na regulação da osmolaridade seja importante devido ao fato de não perturbarem a estrutura e função de proteínas intracelulares, mesmo quando estão em altas concentrações, e são por isso chamados de solutos “compatíveis” (YANCEY *et al.*, 1982; YANCEY, 2005). Dentre as moléculas orgânicas utilizadas no controle da pressão osmótica, os aminoácidos e seus derivados são os solutos dominantes para uma ampla diversidade de organismos filogeneticamente distintos, sendo glicina, alanina, prolina, taurina e β -alanina os osmólitos mais comuns devido à baixa capacidade de exercer efeito ativador ou inibidor na atividade de enzimas (YANCEY *et al.*, 1982).

Nesse sentido, moluscos geralmente apresentam uma alta concentração de aminoácidos livres no fluido intracelular, e são capazes de modular os níveis desses aminoácidos de acordo com a osmolaridade do fluido extracelular, aumentando a concentração de aminoácidos livres no interior da célula (obtidos a partir de degradação de proteínas) quando expostos à hiperssalinidade. Na hipossalinidade, reduzem a concentração de aminoácidos intracelulares, secretando-os na hemolinfa ou degradando-os, aumentando a excreção de amônia e conservando a cadeia carbônica (BARTBERGER & JR., 1976; ZURBURG & DE ZWAAN, 1981; VINU CHANDRAN, 2002; LARSEN *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2016).

No presente estudo, a exposição de *N. concinna* à baixa salinidade foi capaz de modular positivamente os níveis de PK, AST e GDH do pé muscular de *N. concinna* (figura 43). O aumento de AST e GDH, duas enzimas do metabolismo nitrogenado, sugere a participação de aminoácidos na regulação osmótica no pé muscular de *N. concinna*. Nesse caso AST poderia, via transaminação do aspartato com α -cetoglutarato, formar oxaloacetato e glutamato. O oxaloacetato poderia então ser direcionado para oxidação no ciclo do ácido cítrico com finalidade energética. Já o glutamato, poderia ser desaminado pela GDH, originando α -cetoglutarato, o qual também é substrato do ciclo do ácido cítrico. Dessa forma, a adaptação à hipossalinidade poderia envolver a redução da concentração de aminoácidos, como aspartato e glutamato, e formação de intermediários do ciclo do ácido cítrico, além de elevação de PK para suprir a demanda energética do pé muscular. Também foi observada uma interação salinidade-tempo capaz de elevar os níveis de PK, LDH, IDH e MDH após 6 horas de exposição à hipossalinidade, sugerindo um aumento da demanda energética no pé muscular após 6 horas de exposição à baixa salinidade.

O níveis de GDH (WICKES & MORGAN II, 1976; BELL *et al.*, 2012) e AST (WICKES & MORGAN II, 1976; BOUTET *et al.*, 2005) têm sido associados com a manutenção da osmolaridade durante a alteração salina em animais osmoconformistas. Nesse sentido, a modulação de ambas as enzimas no pé muscular de *N. concinna* na exposição à baixa salinidade está de acordo com os dados da literatura.

Os baixos níveis de GDH do pé muscular de *N. concinna*, e os níveis branquiais abaixo do limite de detecção do método utilizado, não é atípico em moluscos (WICKES & MORGAN II, 1976; REISS *et al.*, 1977; ZURBURG & DE

ZWAAN, 1981; BISHOP *et al.*, 1983). A baixa atividade metabólica de gastrópodes e bivalves pode explicar parcialmente os baixos níveis de GDH presentes nos tecidos (BISHOP *et al.*, 1983). Contudo, o conhecimento limitado das propriedades cinéticas da GDH de moluscos, pode ser responsável por medidas de atividade em condições sub ótimas e, consequentemente, responsável por níveis subdimensionados de concentração catalítica dessa enzima em tecidos de moluscos (ZURBURG & DE ZWAAN, 1981).

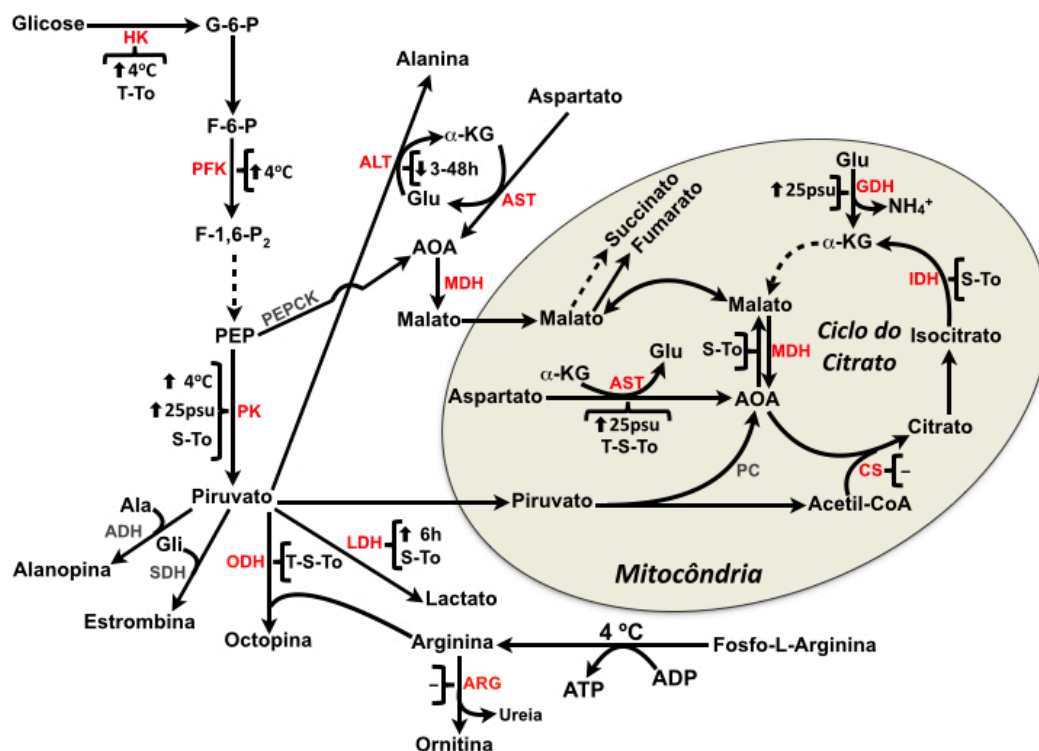


Figura 43. Metabolismo energético e nitrogenado do pé muscular de *Nacella concinna* durante o estresse térmico e hipossalino. As enzimas hexoquinase (HK) fosfofrutoquinase (PFK), piruvato quinase (PK), lactato desidrogenase (LDH), octopina desidrogenase (ODH), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), citrato sintase (CS), malato desidrogenase (MDH), isocitrato desidrogenase (IDH), glutamato desidrogenase (GDH) e arginase (ARG) foram utilizadas no presente estudo (em vermelho) como marcadores do metabolismo energético e nitrogenado no pé muscular de *N. concinna*. As enzimas cujos níveis estavam abaixo do limite de detecção dos métodos utilizados fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), piruvato carboxilase (PC), alanopina desidrogenase (ADH) e estrombina desidrogenase (SDH) estão em cinza. Os resultados estão indicados em colchetes à frente das siglas das enzimas. Os efeitos dos fatores sobre os níveis enzimáticos do pé muscular de *N. concinna* estão indicados por setas (↑, aumento ou ↓, redução) e traços (-), sinalizando ausência de modulação, na temperatura de 4 °C e salinidade de 25 psu. As interações salinidade-tempo (S-To), temperatura-tempo (T-To) e temperatura-salinidade-tempo (T-S-To) estão indicadas na figura. O efeito do tempo está indicado numericamente em horas. Setas pontilhadas indicam reações omitidas no esquema. Os intermediários metabólicos α-KG: α-cetoglutarato; G-6-P: glicose-6-fosfato; F-6-P: frutose-6-fosfato; F-1,6-P₂: frutose-1,6-bisfosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; AOA: oxaloacetato; Ala: alanina; Gli: glicina; Glu: glutamato estão indicados na figura.

Também ficou evidente no presente estudo uma interação temperatura-salinidade-tempo capaz de modular os níveis de ODH no pé muscular. Nesse caso, foi observado um aumento da enzima em 3 h de exposição à 0 °C e 25 psu, e posterior redução em 6 h e nos tempos subsequentes, nessa mesma condição termo-salina. Esse aumento de ODH em 3 h a 0-25, e redução em 6 h coincide com o aumento de LDH que ocorre somente em 0-25-6h, mas não em 3 h, sugerindo que no início do estresse salino, possivelmente a ODH tenha participação na reoxidação do $\text{NADH}+\text{H}^+$ formado na via glicolítica, permitindo a continuidade da via. Subsequentemente, o aumento dos níveis de LDH e a redução dos níveis de ODH, sugerem alternância do potencial de reoxidação de $\text{NADH}+\text{H}^+$.

Nas brânquias, a exposição à baixa salinidade foi capaz de elevar os níveis de PFK, CS e IDH, mostrando que ocorreu um aumento do potencial metabólico energético desse tecido (figura 44). O aumento de CS e IDH sinaliza que a exposição à hipossalinidade elevou o potencial metabólico aeróbio gerador de ATP (LANNIG *et al.*, 2005; TORRES *et al.*, 2012). Como o metabolismo excretório branquial envolve a troca de íons com o ambiente, a elevação do potencial metabólico aeróbio sugere que a condição hipossalina pode ter elevado a demanda energética desse tecido. Também foi observada uma interação termo-salina capaz de elevar os níveis de PFK em 0-25 e 4-35, bem como uma interação salinidade-tempo capaz de reduzir os níveis de MDH após 12 h em 25 psu. O aumento dos níveis de PFK tem sido associado com a regulação fina do fluxo glicolítico, considerando que esse é um ponto regulatório crucial de controle do metabolismo aeróbio e anaeróbio dos organismos (CROCKETT & SIDELL, 1990; SIMPFENDÖRFER *et al.*, 2006).

A temperatura não foi capaz de modular os níveis das enzimas branquiais analisadas. Já no pé muscular, o aquecimento em 4 °C aumentou os níveis das enzimas chaves da via glicolítica (HK, PFK e PK), elevando a capacidade oxidativa de glicose e, conseqüentemente, o potencial aeróbio e anaeróbio gerador de ATP. Considerando que PFK e HK são enzimas descritas como reguladoras e marca-passo da via glicolítica em diversos tecidos, a elevação dos níveis dessas enzimas, tem um impacto potencialmente maior sobre a velocidade dessa via do que outras enzimas (DIENI & STOREY, 2011; MULUKUTLA *et al.*, 2014). Contudo, não ficou

claro qual o destino metabólico do piruvato formado na via, considerando que os níveis de ODH, LDH, ALT e CS não foram modulados.

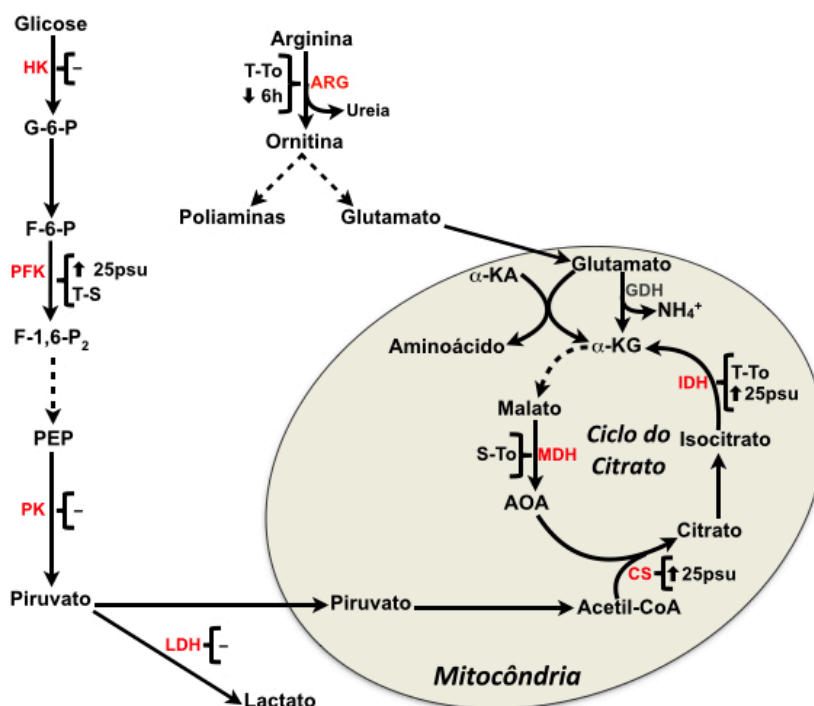


Figura 44. Metabolismo energético e nitrogenado branquial de *Nacella concinna* durante o estresse térmico e hipossalino. As enzimas hexoquinase (HK) fosfofrutoquinase (PFK), piruvato quinase (PK), lactato desidrogenase (LDH), citrato sintase (CS), malato desidrogenase (MDH), isocitrato desidrogenase (IDH) e arginase (ARG), foram utilizadas no presente estudo (em vermelho) como marcadores do metabolismo energético e nitrogenado de brânquias de *N. concinna*. A enzima glutamato desidrogenase (GDH), cujos níveis estavam abaixo do limite de detecção do método utilizado, está em cinza. Os resultados estão indicados em colchetes à frente das siglas das enzimas. Os efeitos dos fatores sobre os níveis enzimáticos das brânquias de *N. concinna* estão indicadas por setas (↑, aumento ou ↓, redução) e traços (-), sinalizando ausência de modulação, na temperatura de 4 °C e salinidade de 25 psu. As interações termo-salina (T-S), salinidade-tempo (S-To) e temperatura-tempo (T-To) estão indicadas na figura. O efeito do tempo está indicado numericamente em horas. Setas pontilhadas indicam reações omitidas no esquema. Os intermediários metabólicos α-KG: α-cetoglutarato; G-6-P: glicose-6-fosfato; F-6-P: frutose-6-fosfato; F-1,6-P₂: frutose-1,6-bisfosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; α-KA: α-cetoácido; AOA: oxaloacetato estão indicados na figura.

Na aclimação térmica de diversos organismos, o aquecimento normalmente reduz a densidade mitocondrial e diminui a demanda de oxigênio, necessária para atender as necessidades energéticas e recompor o gradiente de prótons, o qual tem seu vazamento acentuado pelo aquecimento (PÖRTNER, 2001). Em *N. concinna*, a exposição à 3 °C por três meses não resultou em redução na densidade mitocondrial no pé muscular, mas apenas diminuiu a área superficial da membrana mitocondrial interna, reduzindo assim a área disponível para vazamento

de prótons, o desperdício energético e, conseqüentemente, a capacidade aeróbica do tecido (MORLEY *et al.*, 2009b).

Dessa forma, a redução da capacidade aeróbica no pé muscular no aquecimento, associado ao fato de que o pé muscular de *N. concinna* apresenta fibras tipicamente anaeróbicas e pobres em mitocôndrias (MORLEY *et al.*, 2009b), sugerem que o metabolismo anaeróbio é o provável destino do piruvato formado na via glicolítica, que pode ser utilizado nas reações catalisadas pelas enzimas ODH, ALT e LDH.

No presente estudo, foram analisadas apenas as seguintes opinas desidrogenases: ODH, ADH e SDH. Entretanto, existem outras opinas desidrogenases, como tauropina desidrogenase e β -alanopina desidrogenase, que conjugam piruvato com taurina e β -alanina, respectivamente. Além disso, acredita-se que possivelmente existam outras opinas desidrogenases em moluscos ainda desconhecidas (GRIESHABER *et al.*, 1994; HARCET *et al.*, 2013). Dessa forma, o piruvato formado no pé muscular de *N. concinna* poderia ter outros destinos metabólicos além do que foi determinado no presente estudo, e o assunto permanece em discussão.

Os ectotérmicos antárticos geralmente têm capacidade limitada de aclimação à elevação de temperatura, especialmente quando esse aumento ocorre num curto espaço de dias ou semanas (PECK *et al.*, 2009). Nesse sentido, a incapacidade das brânquias de *N. concinna* modular o seu metabolismo energético, no aquecimento de curto prazo, pode ter relação com a lenta capacidade de aclimação desse gastrópode ao estresse térmico (MORLEY *et al.*, 2011), o qual superou as 48 horas de duração do presente estudo.

A capacidade limitada de aclimação ao aquecimento de *N. concinna* ficou evidente nos estudos conduzidos por Peck *et al.* (2004) e Davenport (1997). O aquecimento em temperaturas acima de 9 °C tem resultado no declínio do consumo de oxigênio e acúmulo de produtos finais do metabolismo anaeróbio (PÖRTNER *et al.*, 1999b; MORLEY *et al.*, 2009a). Estudos conduzidos por Obermüller (2011) e Davenport (1997) mostraram que a temperatura letal para 50% desses patelídeos, coletados durante o verão, foram de 12,4 °C e 15,6 °C, respectivamente. Todavia, a exposição de *N. concinna* à 2 °C por 24 horas, mostrou que 50% dos espécimes reduziram a capacidade de retornar a concha para posição correta, quando os

espécimes foram virados com o pé muscular para cima (PECK *et al.*, 2004), além de ocorrer um declínio da taxa de locomoção (DAVENPORT, 1997), o que pode comprometer processos fisiológicos importantes, como alimentação.

Os níveis de ARG do pé muscular não foram afetados pelo aquecimento e nem pela baixa salinidade. Contudo, o tecido branquial de *N. concinna* modulou os níveis de ARG ao longo do tempo experimental, com redução no tempo de 6h. Por outro lado, uma interação temperatura-tempo elevou os níveis de ARG em 4 °C – 3 h, reduziu em 4 °C – 6 h e manteve os níveis de ARG nos tempos subsequentes. Em *N. concinna*, o provável papel fisiológico da ARG branquial pode estar relacionado com o controle dos níveis de L-arginina dos fluídos biológicos, considerando que o metabolismo energético desse gastrópode é baseado em proteínas (FRASER *et al.*, 2002).

Ao catalisar a hidrólise de L-arginina, a ARG disponibiliza L-ornitina para a síntese de prolina, glutamato e poliaminas (WU & MORRIS, 1998; YATIN, 2002). As poliaminas atuam em diversos processos biológicos importantes, como crescimento e proliferação celular (IGARASHI & KASHIWAGI, 2010), modulação da estabilidade das estruturas de membranas e ácidos nucleicos (PEGG & CASERO JR, 2011), além de participarem da defesa antioxidante (BELLÉ *et al.*, 2004; COCHÓN *et al.*, 2007; KOURNOUTOU *et al.*, 2014). Em invertebrados marinhos, as poliaminas também estão relacionadas com a regulação osmótica e iônica (LOVETT & WATTS, 1995; BALLANTYNE, 1997).

Considerando que a temperatura pode alterar a performance de processos biológicos, induzir o vazamento de prótons em mitocôndrias, acelerar o estresse oxidativo e desestabilizar membranas biológicas, resultado em danos celulares (PÖRTNER *et al.*, 1999a; AN & CHOI, 2010), a elevação pronunciada dos níveis de ARG no tempo de 3 h em 4 °C pode ter relação com a disponibilização de L-ornitina como precursor da síntese de poliaminas, as quais são de vital importância para manutenção da estrutura celular. Contudo, nos tempos subsequentes, o aumento dos níveis de SOD pode ter contribuído para evitar lesões teciduais.

5.2. Efeito de esgoto

Experimentos conduzidos com peixes e moluscos foram utilizados para avaliar o efeito do esgoto sobre a biota. Diluições variadas do esgoto, até o esgoto *in*

natura, foram utilizados para avaliar respostas histopatológicas, capacidade de bioacumulação de contaminantes, respostas imunológicas e expressão gênica (KAKUTA & MURACHI, 1997; PETTERSSON *et al.*, 2006; AKAISHI *et al.*, 2007; CUKLEV *et al.*, 2012; BINELLI *et al.*, 2014; GRABICOVA *et al.*, 2014).

A hidrodinâmica da área central da Baía do Almirantado apresenta intensa troca de água com o estreito de Bransfield. Mas, essa troca não é tão intensa na enseada onde o efluente do esgoto da EACF é descartado, dificultando a dispersão do efluente. Embora o sedimento marinho próximo à descarga do efluente de esgoto da EACF esteja contaminado por esteroides fecais e alquibenzenos lineares, essa contaminação tem sido considerada pontual (MARTINS *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2005; MONTONE *et al.*, 2010), se restringindo, na coluna d'água, somente a 200 metros no entorno do local de despejo, e a 700 metros no sedimento (MONTONE *et al.*, 2013).

Dessa forma, a escolha das diluições de 0,05% (v/v) e 0,5% (v/v) utilizadas no presente estudo, levou em consideração a diluição que o esgoto lançado pela EACF sofre nas águas da Baía do Almirantado. Entretanto, entender como esse esgoto pode afetar os organismos endêmicos da Antártica, que evoluíram sob as fortes pressões seletivas peculiares da região, é de extrema importância para a preservação da biota local, que apresenta respostas fisiológicas diferentes dos organismos que habitam as regiões temperadas e tropicais.

5.2.1. Defesa antioxidante

O esgoto da EACF foi capaz de modular discretamente a defesa antioxidante da glândula digestiva de *N. concinna*, com aumento dose-dependente do potencial dismutador de $\cdot\text{O}_2^-$. O aumento dos níveis de GST na diluição 0,05% (v/v) maior do que em 0,5% (v/v), sugere um efeito hormético, onde a maior diluição tem um efeito mais pronunciado do que a menor diluição (CALABRESE, 2005). Já o aumento dos níveis de CAT só se mostrou significativo quando os valores das duas diluições de esgoto foram agrupadas ($p=0,0166$). Dessa forma, o aumento dos níveis de SOD, CAT e GST mostrou que o efluente do esgoto da EACF é capaz de induzir resposta antioxidante protetora na glândula digestiva de *N. concinna* (figura 45).

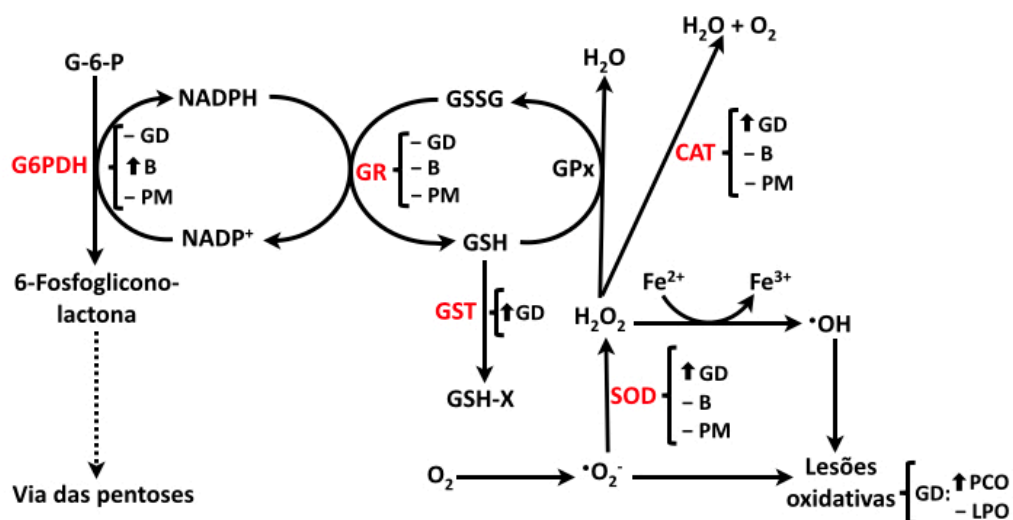


Figura 45. Defesa antioxidante de *Nacella concinna* durante a exposição ao esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF). As enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH); glutatona redutase (GR); glutatona S-transferase (GST); superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), foram utilizadas no presente estudo (em vermelho) como marcadores da defesa antioxidante. Os resultados estão indicados em colchetes à frente das siglas das enzimas. Os efeitos do esgoto sobre os níveis enzimáticos da glândula digestiva (GD), brânquias (B) e pé muscular (PM) estão indicados por setas (↑, aumento ou ↓, redução) e traços (-), sinalizando ausência de modulação. Setas pontilhadas indicam reações omitidas no esquema. GPX: glutatona peroxidase; PCO: carbonilação de proteínas; LPO: peroxidação lipídica; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada.

A comparação de respostas biológicas de organismos expostos aos efluentes de esgoto é dificultada pela heterogeneidade da composição dos esgotos, os quais são misturas complexas. Contudo, o aumento dos níveis de CAT e peroxidação lipídica do *pool* de tecidos moles dos bivalves *Scrobicularia plana* e *Cerastoderma edule*, expostos ao efluente de esgoto não tratado (BERGAYOU *et al.*, 2009), foi capaz de induzir o estresse oxidativo e modular positivamente a defesa antioxidante desses moluscos. A exposição do bivalve *Dreissena polymorpha* ao triclosan, um composto bastante utilizado em produtos de higiene pessoal, e por isso geralmente presente em efluentes de esgoto despejados no ambiente, resultou no aumento de GST, SOD e CAT nos tecidos moles desse molusco (BINELLI *et al.*, 2011).

Não foram observadas alterações significativas nos níveis de LPO da glândula digestiva. O aumento de PCO na diluição de 0,05% (v/v), sem alteração dos níveis desse marcador na diluição de 0,5% (v/v), pode estar relacionado com o aumento dos níveis de SOD e CAT na diluição 0,5% (v/v). Dessa forma, o aumento de PCO na diluição de 0,05% (v/v) pode ser decorrente de uma defesa antioxidante incapaz de neutralizar adequadamente as espécies reativas de oxigênio formadas

no estresse por esgoto. Todavia, o aumento do potencial antioxidante da glândula digestiva, na presença do esgoto em 0,5% (v/v), sugere que a defesa antioxidante foi capaz de evitar danos oxidativos as proteínas.

O efluente do esgoto em ambas as diluições foi capaz de elevar o potencial gerador de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ do tecido branquial. Tendo em vista que o $\text{NADPH} + \text{H}^+$ é um substrato limitante para a GR (RIGANTI *et al.*, 2012), o aumento dos níveis de G6PDH favorece a manutenção do potencial redox, essencial para manutenção de glutathiona reduzida. Sáenz e colaboradores (2010) encontraram um resultado diferente com o bivalve *Perna perna*, onde a exposição ao esgoto urbano não foi capaz de alterar os níveis de G6PDH nas brânquias desse molusco. Os autores também verificaram que, semelhante ao observado no presente estudo, não houve alteração significativa nos níveis de GR branquial. Já o bivalve marinho *Meretrix meretrix*, exposto a diferentes diluições de esgoto, foi capaz de modular positivamente SOD, CAT e GR branquiais (WAN *et al.*, 2015).

Glândula digestiva, pé muscular e brânquias de *N. concinna* apresentam potencial antioxidante bem distintos, especialmente naquilo que diz respeito à capacidade de decompor o H_2O_2 produzido pelos tecidos. Comparando o potencial de decomposição de H_2O_2 dos tecidos de *N. concinna* e, considerando apenas os dados dos grupos controles (condição termo-salina 0 °C – 35 psu), foi possível perceber que na aclimação de curto prazo (48 h) e de médio prazo (8 dias), a glândula digestiva manteve aproximadamente o mesmo nível de CAT (≈ 350 U/mg de proteína). Isso também ficou evidente no tecido branquial, onde os níveis de CAT foram mantidos em aproximadamente 80 U/mg de proteína, tanto no curto quanto no médio prazo de aclimação. Contudo o pé muscular apresentou uma forte redução dos níveis de CAT no médio prazo (3,8 U/mg de proteína), comparado ao curto prazo (6,0 U/mg de proteína), mostrando que o tempo de aclimação desse gastrópode pode modular os níveis de CAT. Aparentemente, a condição termo-salina estável em 0 °C – 35 psu, por mais de dois dias, pode levar à redução de CAT no pé muscular, possivelmente devido à ausência das condições estressantes naturais da zona entremarés da Antártica. Resultados semelhantes foram observado por Feijó de Oliveira (2013), onde os animais submetidos à condição termo-salina de 0 °C e 35 psu durante 8 dias apresentaram redução significativa dos níveis de CAT no pé muscular quando comparado ao referencial da natureza.

Aparentemente, o tecido mais afetado pela exposição ao esgoto foi a glândula digestiva, que modulou positivamente os níveis de SOD, GST e CAT, seguido das brânquias, que modulou positivamente os níveis de G6PDH. Já o pé muscular não modulou os níveis das enzimas analisadas. Essa diferença entre os tecidos pode estar relacionada com a via de exposição. O pé muscular, apesar do contato direto com a água, pode não estar absorvendo suficientemente os componentes do esgoto para levar à alterações significativas da defesa antioxidante. Somado a isso, o pé muscular produz o muco, que pode ter conferido uma proteção, reduzindo o contato do tecido com a água. Já as brânquias, que efetuam trocas com o ambiente, estão mais expostas aos contaminantes dissolvidos na água do mar. A capacidade da glândula digestiva modular de forma mais expressiva a sua defesa antioxidante, pode ter relação com a maior exposição desse tecido ao esgoto via ingestão de água, ou via contato com a hemolinfa, que poderia levar contaminantes filtrados pelas brânquias para a glândula digestiva, considerando que esse tecido é banhado pela hemolinfa. A glândula digestiva de gastrópodes também tem papel central na detoxificação de xenobióticos potencialmente lesivos, tornando-a mais susceptível à ação nociva desses compostos (LIVINGSTONE, 1991).

5.2.2. Metabolismo energético e nitrogenado

A PFK é a principal enzima reguladora da via glicolítica, desempenhando papel fundamental no controle dos níveis de hexoses-fosfato, tanto em organismos aeróbios quanto anaeróbios (IBARGUREN *et al.*, 2000; SIMPFENDÖRFER *et al.*, 2006). Normalmente, a PFK é a enzima de menor atividade da via glicolítica e tem sido considerada marca passo do metabolismo oxidativo de carboidratos em diversos tecidos (ALVES *et al.*, 2007). Além da PFK, as enzimas HK e PK são consideradas reguladoras da via glicolítica e catalisam, respectivamente, a primeira e a última reação dessa via.

O esgoto não foi capaz de modular o potencial ativador de glicose no pé muscular de *N. concinna* em nenhuma das duas diluições de esgoto. Contudo, a modulação positiva dos níveis de PFK e PK, observada no esgoto diluído para 0,05% (v/v), obedece ao fenômeno hormético, caracterizado por uma estimulação em baixa dose e inibição em uma dose elevada (CALABRESE, 2005). O aumento do potencial glicolítico sinalizado pelo aumento dos níveis de PFK e PK, sugere um provável aumento da demanda energética desse tecido. Contudo, não foram

observadas alterações significativas dos níveis das enzimas do metabolismo aeróbio (CS, IDH e MDH) ou anaeróbio (LDH, ODH, ALT e AST) dosadas (figura 46).

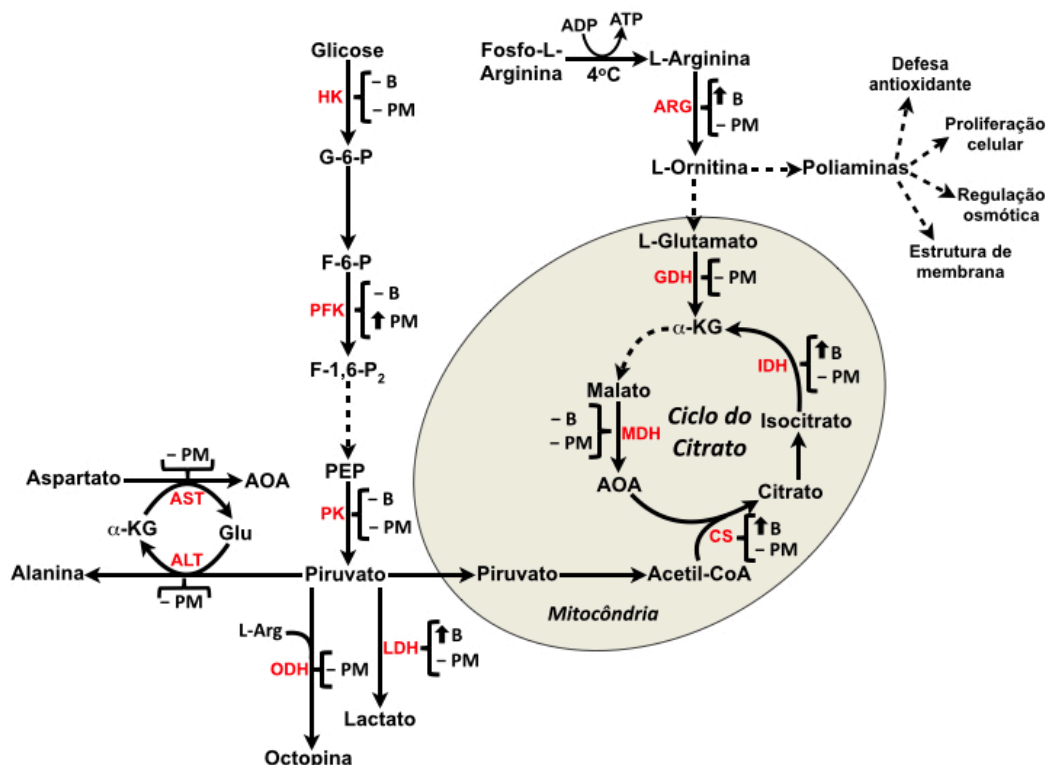


Figura 46. Metabolismo energético e nitrogenado de *Nacella concinna* durante a exposição ao esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF). As enzimas hexoquinase (HK) fosfofrutoquinase (PFK), piruvato quinase (PK), lactato desidrogenase (LDH), octopina desidrogenase (ODH), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), citrato sintase (CS), malato desidrogenase (MDH), isocitrato desidrogenase (IDH), arginase (ARG) e glutamato desidrogenase (GDH) foram utilizadas no presente estudo (em vermelho) como marcadores do metabolismo energético e nitrogenado. Os resultados estão indicados em colchetes à frente das siglas das enzimas. Os efeitos do esgoto sobre os níveis enzimáticos das brânquias (B) e pé muscular (PM) estão indicados por setas (↑, aumento ou ↓, redução) e traços (-), sinalizando ausência de modulação. Setas pontilhadas indicam reações omitidas no esquema. Os intermediários metabólicos α-KG: α-cetoglutarato; G-6-P: glicose-6-fosfato; F-6-P: frutose-6-fosfato; F-1,6-P₂: frutose-1,6-bisfosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; AOA: oxaloacetato; Glu: glutamato; L-arg: L-arginina estão indicados na figura.

Morley e colaboradores (2009b) verificaram que o pé muscular de *N. concinna* apresenta fibras musculares tipicamente anaeróbicas, pobres em mitocôndrias e com provável predominância de metabolismo glicolítico. O presente estudo corrobora com essa hipótese, tendo em vista que, ao comparar os controles experimentais, foi possível observar que os níveis das enzimas CS, IDH e MDH do pé muscular, marcadoras do metabolismo aeróbio, são 65%, 57% e 35% menores em relação aos níveis dessas enzimas nas brânquias, respectivamente.

O aumento dos níveis de CS e IDH branquiais, sugere uma modulação positiva do metabolismo aeróbio desse tecido na exposição ao esgoto, sendo que o aumento dos níveis de CS obedeceu ao fenômeno hormético (CALABRESE, 2005). Já os níveis de MDH, outra enzima participante do ciclo do ácido cítrico, não foi modulada na presença do esgoto. Contudo, os níveis branquiais de MDH são cerca de 18 e 32 vezes maiores do que os níveis de CS e IDH, respectivamente, sugerindo que os níveis relativamente elevados de MDH podem ser suficientes para suprir o aumento da demanda aeróbica desse tecido. A exposição ao esgoto modulou positivamente os níveis de LDH, mostrando que o metabolismo anaeróbio também é induzido na exposição ao esgoto. Todavia, o aumento dos níveis de LDH só ficou evidente ao agrupar os dados das duas diluições de esgoto para a análise estatística.

As arginases são enzimas amplamente distribuídas na natureza em tecidos animais, e em organismos não ureotélicos, a presença de ARG tem sido relacionada com a regulação dos níveis do aminoácido L-arginina (JENKINSON *et al.*, 1996). Apesar de *N. concinna* utilizar lipídeos e carboidratos como substratos energéticos, o seu metabolismo energético é baseado em proteínas (CLARKE, 1989; PECK & VEAL, 2001; FRASER *et al.*, 2002). Nesse sentido, os níveis relativamente elevados de ARG das brânquias de *N. concinna*, possivelmente participam do controle sistêmico dos níveis de L-arginina. Já a ARG do pé muscular, possivelmente participa do controle do catabolismo da L-arginina, que é parte integrante do sistema de reserva energética estocada na forma de fosfo-L-arginina (RODRIGUES *et al.*, 2011).

A ARG catalisa a hidrólise de L-arginina em L-ornitina e ureia, e dessa forma, fornece ornitina para a síntese de poliaminas, prolina e glutamato (WU & MORRIS, 1998; YATIN, 2002). As poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) são componentes essenciais na proliferação e ciclo celular, além de atuarem na defesa antioxidante (especialmente espermidina e espermina), (MATKOVICS *et al.*, 1993; COCHÓN *et al.*, 2007; RIDER *et al.*, 2007; IGARASHI & KASHIWAGI, 2010; PEGG & CASERO JR, 2011).

A ARG do pé muscular de *N. concinna* não foi modulada pelo esgoto, diferente dos níveis de ARG branquial que apresentou um aumento dose dependente. Essa modulação positiva pode estar relacionada com um aumento da

demanda de ornitina para a síntese de poliaminas em resposta ao poluente. O esgoto é uma mistura complexa, que pode causar alterações sub-letais em brânquias, como foi observado no peixe antártico *Trematomus bernacchii* coletados em pontos a menos de 800 metros de distância do local de despejo do efluente de esgoto da estação australiana Davis. Em brânquias, as patologias mais comumente observadas foram proliferação de células epiteliais, com fusão lamelar (CORBETT *et al.*, 2014). Em espécimes do peixe *Trematomus newnesi* coletados próximos à saída de esgoto da EACF foi observado vacuolização lipídica e presença de macrófagos no fígado, além de hipertrofia do epitélio e telangiectasia lamelar em brânquias (CAMPOS, 2007). Somado a isso, a genotoxicidade do esgoto da EACF ficou evidente no estudo conduzido por Rocha e colaboradores (2015), onde foi encontrado aumento de danos em DNA hemocitário no anfípoda *Gondogeneia antarctica* coletado em local próximo ao ponto de despejo de esgoto da EACF.

Nesse sentido, o aumento da síntese de poliaminas estaria favorecendo o reparo das lesões e participando da defesa antioxidante. Já o aumento de G6PDH branquial observado na exposição ao esgoto, pode estar associado tanto à defesa antioxidante, quanto a uma maior demanda de pentoses-fosfato para a síntese de ácidos nucleicos, subsidiando a proliferação celular e os mecanismos de reparo tecidual. Associado a isso, a modulação positiva de ARG pode estar relacionada à produção de ornitina para síntese de poliaminas, que desempenham papel importante na indução do ciclo celular, bem como na defesa antioxidante.

Resultado semelhante foi encontrado por Rodrigues Jr. (2015) em nototeniídeos antárticos. Nesse caso, os peixes *Nototothenia rossii* e *Nototothenia coriiceps* expostos ao efluente de esgoto da EACF durante 96 h, apresentaram aumento de G6PDH e ARG branquiais.

O grupo amino de diversos aminoácidos pode ser transferido, via transaminação para o α -cetoglutarato, formando glutamato e um α -cetoácido. Subsequentemente, o glutamato pode ser desaminado por ação da GDH, formando amônia e α -cetoglutarato, disponibilizando dessa forma, as cadeias carbônicas de aminoácidos para as vias oxidativas do metabolismo energético. Dada a importância da GDH, tanto para o metabolismo energético quanto nitrogenado, essa enzima tem sido postulada como chave em animais que vivenciam alterações drásticas na fisiologia celular em resposta a condições ambientais severas (CIARDIELLO *et al.*,

1997; RODRIGUES *et al.*, 2009; BELL *et al.*, 2012). Em animais osmoconformistas, a GDH tem função importante na manutenção da osmolaridade durante a alteração salina (WICKES & MORGAN II, 1976; BELL *et al.*, 2012).

Enquanto as brânquias apresentam níveis de GDH abaixo do limite da detecção do método utilizado no presente estudo, o pé muscular expressa GDH em níveis detectáveis. Contudo, o efluente do esgoto da EACF não foi capaz de modular os níveis dessa enzima. Semelhante ao observado no presente estudo, Wickes & Morgan II (1976) encontraram níveis detectáveis de GDH no músculo da ostra *Crassostrea virginica* e indetectáveis nas brânquias.

5.3. Caracterização das arginases de *Nacella concinna*

5.3.1. Localização tecidual e sucelular de arginases em *N. concinna*

Os níveis elevados de ARG nas brânquias de *N. concinna* sugerem a sua participação no controle sistêmico dos níveis de L-arginina, considerando que esse gastrópode excreta sazonalmente de 3% à 24% do seu nitrogênio na forma de ureia, e apresenta um metabolismo energético baseado em proteínas (FRASER *et al.*, 2002). As arginases catalisam a etapa terminal do ciclo da ureia de ureotélicos, e controlam a disponibilidade tecidual do aminoácido L-arginina para síntese de uma ampla faixa de composto nitrogenados, tais como proteínas, óxido nítrico, poliaminas, fosfo-L-arginina e glutamato (WIESER & PLATZER, 1983; JENKINSON *et al.*, 1996; WU & MORRIS, 1998; MOINARD *et al.*, 2005).

A excreção nitrogenada de moluscos é bem conhecida, mas a origem da ureia ainda permanece obscura, pois essa pode ser formada via ciclo da ureia, hidrólise de L-arginina ou por uricólise (CHENG *et al.*, 2004). A ampla presença de L-arginina em proteínas da dieta (HIRD, 1986) pressupõe o catabolismo desse aminoácido como forma de controle, principalmente em organismos que apresentam um metabolismo energético baseado em proteínas (RODRIGUES *et al.*, 2007).

A distribuição tecidual de arginases em animais não segue um padrão filogenético (ANDREWS & REID, 1972) e níveis elevados dessa enzima foram encontrados no fígado e rins de vertebrados (CVANCARA, 1969; AMINLARI & VASEGHI, 1992), hepatopâncreas (GASTON & CAMPBELL, 1966; ANDREWS & REID, 1972; PORTUGAL & AKSNES, 1983), rim (RODRIGUES *et al.*, 2009) e brânquias (CARVAJAL *et al.*, 1984) de moluscos.

5.3.2. Saturação das arginases de *N. concinna* por L-arginina

Diferente de vários estudos conduzidos com arginases de invertebrados, os estudos cinéticos conduzidos com as arginases de *N. concinna* foram levados a efeito em pH 7,4 tendo como base o pH dos fluídos branquiais desse gastrópode (WEIHE & ABELE, 2008). As curvas de saturação da ARG branquial para L-arginina foram típicas de enzimas hiperbólicas com um único sítio ativo, e valor de K_M próximo da ARG renal do bivalve antártico *Laternula elliptica* (RODRIGUES *et al.*, 2009). Contudo, valores bem menores de K_M foram descritos para as arginases de bivalves não antárticos, como *Semele solida* (CARVAJAL *et al.*, 1994a) e *Dreissena polymorpha* (TORMANEN, 1997). A inibição das arginases de *N. concinna* por L-arginina acima de 80 mM, aparentemente, não tem significado fisiológico, pois a concentração de L-arginina do pé muscular desse gastrópode (PÖRTNER *et al.*, 1999b) é cerca de 20 vezes menor do que a concentração inibitória da ARG. Concentrações elevadas de L-arginina inibiram as arginases de alguns invertebrados em pH próximo de 9,5 (CAMPBELL, 1966; HANLON, 1975), embora a inibição da ARG muscular do molusco *Chiton latus* em pH 9,5 não tenha sido confirmada em pH 7,5 (CARVAJAL *et al.*, 1988).

Geralmente, músculos apresentam níveis baixos ou indetectáveis de ARG (CARVAJAL *et al.*, 1984). Contudo, o pé muscular de *N. concinna* apresenta níveis relativamente elevados de ARG, com valor de K_M cerca de 8 vezes maior do que a concentração de L-arginina do pé muscular (PÖRTNER *et al.*, 1999b; RODRIGUES *et al.*, 2009). Na condição onde $K_M \gg [\text{substrato}]$, a velocidade das reações enzimáticas variam linearmente em função da concentração do substrato (SEGEL, 1993). Assim, potencialmente a ARG do pé muscular de *N. concinna* pode modular os níveis de L-arginina *in vivo*.

A principal via de remoção da L-arginina formada no pé muscular de moluscos, durante a transferência de fosfatos de alta energia da fosfo-L-arginina para o *pool* de adenilatos, envolve a biossíntese de octopina, que é catalisada pela enzima octopina desidrogenase (PÖRTNER, 2002). Contudo, o pé muscular de *N. concinna* não acumula octopina na decomposição de fosfágenos, mostrando que a remoção de L-arginina deve ocorrer por um outro caminho metabólico (PÖRTNER *et al.*, 1999b). No caso do gastrópode *Helix pomatia*, a remoção do excesso de L-arginina formada nessa mesma condição metabólica, ocorre via reação catalisada

pela ARG (WIESER & PLATZER, 1983). Assim, a ARG do pé muscular pode ser a enzima chave do sistema regulatório de L-arginina na remoção de fosfágenos em *N. concinna*.

Estudos com invertebrados priorizaram a distribuição tecidual das arginases, sem investigar a compartimentalização subcelular. O pé muscular e brânquias de *N. concinna* têm as suas atividades argininolíticas concentradas no citosol, semelhante ao que ocorre na brânquia do bivalve marinho *S. solida* (CARVAJAL *et al.*, 1994a).

Vertebrados normalmente expressam duas isoformas de arginases em seus tecidos. O tipo I (ARG1), presente no citosol do fígado de animais ureotélicos, catalisa a etapa terminal do ciclo da ureia. Já o tipo II (ARG II), que é mitocondrial, tem sido apontado como responsável pelo controle tecidual dos níveis de L-arginina (JENKINSON *et al.*, 1996). Essas duas isoformas tiveram as suas origens na duplicação do gene da ARG, que ocorreu em algum momento anterior à divergência de anfíbios para mamíferos (PEROZICH *et al.*, 1998; SRIVASTAVA & RATHA, 2013a). Muitos microrganismos têm somente um gene de ARG, embora *Schizosaccharomyces pombe* tenha genes de ARG I e II (PEROZICH *et al.*, 1998; SAMSON, 2000). Uma grande distância evolutiva separa vertebrados de microrganismos, e faltam informações filogenéticas sobre a presença de isoenzimas de arginases em invertebrados marinhos. A expressão das arginases de brânquias e pé muscular de *N. concinna* no citosol é típica de ARG I, mas infelizmente não existem estudos indicando a sua origem filogenética.

Duas das cinco curvas de saturação da ARG do pé muscular de *N. concinna* apresentaram perfis sugestivos da presença de duas ou mais atividades argininolíticas com propriedades cinéticas distintas. Não obstante, a baixa razão entre o número de sítios de alta e baixa afinidade inviabilizou a caracterização cinética desses dois sítios ativos. A quantidade insuficiente de tecido/atividade argininolítica também comprometeu possíveis estudos de caracterização dessas arginases nas frações subcelulares de *N. concinna*. Contudo, a distribuição subcelular da atividade argininolítica (citosol, 85%; mitosol, 15%), reforçam a evidência que as duas formas de ARG podem estar presentes no pé muscular de *N. concinna*.

A existência de arginases com propriedades cinéticas distintas no rim de *L. elliptica* foi associada com metabolismo energético desse bivalve, que também é

baseado em proteínas e demanda controle sobre os níveis de L-arginina (RODRIGUES *et al.*, 2009). No caso dos néfrons do roedor *Meriones shawi*, a presença de isoformas cineticamente distintas de ARG foram associadas com a formação de urina mais concentrada através de mecanismo de contra corrente (HUS-CITHAREL & LEVILLAIN, 1999).

No pé muscular de *N. concinna*, a atividade argininolítica está concentrada no mesmo compartimento celular da enzima arginina quinase de moluscos, a qual catalisa reversivelmente a síntese de fosfo-L-arginina (TAKEUCHI *et al.*, 2004). Como a L-arginina é substrato dessas duas enzimas, a ARG do pé muscular pode potencialmente modular a atividade do sistema de decomposição de fosfágenos, semelhante ao que ocorre na síntese de óxido nítrico, onde ARG e óxido nítrico sintases competem por L-arginina (MORI & GOTOH, 2000).

5.3.3. Efeito de cátions metálicos sobre a atividade argininolítica

A afinidade da ARG do pé muscular de *N. concinna* por cátions metálicos ativadores ($\text{Ni}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$) é substancialmente diferente da ARG branquial ($\text{Mn}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$). Essa afinidade varia muito entre espécies, embora Mn^{2+} seja considerado o provável cátion fisiológico (JENKINSON *et al.*, 1996). As arginases hepáticas de mamíferos são trímeros com um centro de manganês binuclear em cada subunidade, que é responsável pela catálise hidrolítica da L-arginina (CHRISTIANSON & COX, 1999). A retirada de um Mn^{2+} fracamente ligado à estrutura de cada subunidade da ARG hepática de rato, resulta na perda de 50% da atividade, e a remoção do segundo Mn^{2+} fortemente ligado à estrutura, leva à desnaturação da enzima (HIRSCH-KOLB *et al.*, 1971).

O centro binuclear de Mn^{2+} é considerado o ativador fisiológico das arginases, mas Co^{2+} e Ni^{2+} podem substituir o Mn^{2+} na reação (MARINO *et al.*, 2013). A troca de dois Mn^{2+} por dois Co^{2+} foi capaz de desviar a dependência do pH da ARG I humana do pK_a 9,5 para 7,5, aumentando em 10 vezes a eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) dessa enzima em pH 7,4 (STONE *et al.*, 2010; MARINO *et al.*, 2013). A ARG do bivalve *D. polymorpha* também apresentou preferência por Co^{2+} em pH 7,4, mas essa não é uma característica geral das arginases de moluscos, pois a ARG do pé muscular de *N. concinna* foi ativada por $\text{Mn}^{2+} > \text{Co}^{2+}$, e a branquial foi inibida por Co^{2+} , semelhante à ARG renal de *L. elliptica* (tabela 1). A ativação por Ni^{2+} tem sido pouco estudada em pH 7,4, e a preferência das arginases de moluscos

normalmente é $Mn^{2+} > Ni^{2+}$ em pH próximo de 9,5 (CARVAJAL *et al.*, 1984; CARVAJAL *et al.*, 1988; CARVAJAL *et al.*, 1994a).

Tabela 1. Efeito de metais pesados sobre atividade da arginase branquial (NC-B) e do pé muscular (NC-M) do gastrópode *Nacella concinna* (presente estudo), dos tecidos moles do bivalve *Dreissena polymorpha* (DP) (TORMANEN, 1997) e do rim de *Laternula elliptica* (LE) (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Metais	DP	LE	NC-B	NC-M
Controle	100	100	100	100
Mn^{2+}	399	92	175	331
Cu^{2+}	1	56	124	110
Co^{2+}	460	84	82	162
Ni^{2+}	393	55	90	571
Zn^{2+}	25	71	72	91
Fe^{3+}	0	42	77	118
Hg^{2+}	19	44	23	56
Pb^{2+}	ND	ND	97	60
Cd^{2+}	24	74	21	56

A atividade argininolítica foi determinada na presença de 1 mmol/L de cátion metálico, em relação a atividade da arginase sem a adição de cátions metálicos ao sistema de reação (controle).

ND = Não determinado

Até onde temos conhecimento, a ativação por Cu^{2+} é uma característica única das arginases de *N. concinna*, sendo que esse cátion metálico tem sido descrito como um potente inibidor de arginases de bivalves (TORMANEN, 1997; RODRIGUES *et al.*, 2009), peixes (SRIVASTAVA & RATHA, 2013a) e mamíferos (MUNAKATA *et al.*, 1976; TORMANEN, 2001). No caso das arginases I e II de rato, a inibição por Cu^{2+} foi alostérica, e envolveu, provavelmente, a ligação do Cu^{2+} com resíduos de cisteína e histidina fora do sítio ativo (TORMANEN, 2001). Contudo, a formação de centros de Mn^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+} ativadores de arginases também envolvem a ligação desses metais com resíduos de histidina no sítio ativo (D'ANTONIO *et al.*, 2012), tornando o Cu^{2+} um potencial substituto do Mn^{2+} na formação de centros metálicos binucleares. A troca de Mn^{2+} por um outro cátion metálico nem sempre restaura plenamente as funções catalíticas das arginases, visto que a substituição de Mn^{2+} por Cd^{2+} restaurou apenas 15% da atividade da ARG do pé muscular de *C. latus* (CARVAJAL *et al.*, 1988). Assim, a formação de um centro de Cu^{2+} deve ser considerada como um possível mecanismo para explicar a ativação das arginases de *N. concinna*.

A maior tolerância de organismos antárticos ao Cu^{2+} pode ter relação com os níveis naturalmente elevados desse metal em sedimentos marinhos (RODRIGUES *et al.*, 2009; LO GIUDICE *et al.*, 2013), os quais são equivalentes aos das regiões mais poluídas do planeta (AHN *et al.*, 1996; GUERRA *et al.*, 2011). O Cu^{2+} acumulado no rim do bivalve antártico *L. elliptica* é cerca de quatro vezes maior do que no *pool* de tecidos moles do bivalve não antártico *D. polymorpha* (tabela 2), sendo que a ARG renal de *L. elliptica* é expressivamente mais resistente à inibição por Cu^{2+} do que a ARG de *D. polymorpha* (tabela 1). Por outro lado, os níveis de Cu^{2+} do pé muscular de *N. concinna* é apenas o dobro de *D. polymorpha*, mas a razão $\text{Mn}:\text{Cu} = 0,9$ do pé muscular de *N. concinna*, é cerca de seis vezes menor do que ($\text{Mn}:\text{Cu} = 5,8$) em *D. Polymorpha*, e no rim de *L. elliptica* (tabela 2). Considerando que Mn^{2+} é o provável cátion fisiológico ativador das arginases, bem como uma possível competição entre Mn^{2+} e Cu^{2+} pela formação de um centro metálico, a baixa razão $\text{Mn}:\text{Cu}$ do pé muscular de *N. concinna*, pode ter forçado a seleção de as arginases ativadas por Cu^{2+} .

Tabela 2. Níveis de alguns metais pesados ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco) no rim (LE-R) e músculo (LE-M) de *Laternula elliptica* (AHN *et al.*, 1996); pé muscular (NC-M) (CURTOSI *et al.*, 2010) e brânquias (NC-B) (WEIHE *et al.*, 2010) de *Nacella concinna* e *pool* dos tecidos moles do bivalve *Dreissena polymorpha* (DP) (ALCARAZ *et al.*, 2011).

Metais	DP	LE-R	LE-M	NC-B	NC-M
Mn^{2+}	48,3	190,0	102,0	ND	14,6
Cu^{2+}	8,4	33,3	50,0	ND	16,4
Zn^{2+}	79,0	1687,0	115,0	43,0	44,9
Pb^{2+}	0,86	37,7	1,4	ND	0,45
Cd^{2+}	0,30	41,9	3,9	6,2	25,3

ND = Não determinado

A ativação mais eficaz de Cu^{2+} com Co^{2+} em relação a Co^{2+} , Mn^{2+} ou Cu^{2+} isoladamente, revelou uma ação sinérgica desses dois cátions metálico na ativação da ARG do pé muscular de *N. concinna* (tabela 3). Embora Co^{2+} tenha inibido levemente a atividade da ARG branquial, a combinação de Cu^{2+} com Co^{2+} ativou em nível equivalente ao da ativação por Mn^{2+} (tabela 4). A forte ativação da ARG do pé muscular por Ni^{2+} não foi observada na presença de Cu^{2+} , sugerindo que a afinidade da ARG do pé muscular pelo cátion ativador Cu^{2+} é bem maior do que por Ni^{2+} . Já a ARG branquial apresentou um comportamento cinético totalmente diferente em relação ao Ni^{2+} , não sendo ativada nem inibida, mesmo na presença de Cu^{2+} . Uma

das possíveis explicações para o efeito combinado de cátions metálicos sobre a atividade de arginases seria a capacidade das arginases formarem centros metálicos heteronucleares com atividades distintas. Nesse sentido, a formação $Mn^{2+}Co^{2+}$ *in vitro* foi capaz de restaurar parcialmente as funcionalidades da Mn^{2+} ARG I H1O1N de rato (D'ANTONIO *et al.*, 2012).

Tabela 3. Efeito de metais sobre a atividade argininolítica do pé muscular de *Nacella concinna*. As atividades argininolíticas foram determinadas em sistemas de reação contendo um cátion metálico 1 mmol/L⁻¹, e dois cátions metálicos, cada um 1 mmol.L⁻¹. Atividade foi relativizada em função do controle (sem adição de cátions metálicos), ao qual foi atribuído o valor de 100%.

Cátions Metálicos	Mn ²⁺	Cu ²⁺	Co ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺	Fe ³⁺	Pb ²⁺	Hg ²⁺	Cd ²⁺
Mn ²⁺	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑	---	↑↑	↑↑	↓↓	↓
Cu ²⁺		↑	↑↑↑↑	↑	↓	↓	↓	↓↓	---
Co ²⁺			↑	na	na	na	na	na	na
Ni ²⁺				↑↑↑↑↑	na	na	na	na	na
Zn ²⁺					---	na	na	na	na
Fe ³⁺						---	na	na	na
Pb ²⁺							↓	na	na
Hg ²⁺								↓	na
Cd ²⁺									↓

(↑) = grau de ativação em relação ao controle (uma seta em até 200%, duas setas entre 200% e 300%; três setas entre 300% e 400% e quatro setas entre 400% e 500%; cinco setas entre 500% e 600%) ; (↓) = grau de inibição em relação ao controle (uma seta em até 50% da atividade do controle; duas setas entre zero e 50% do controle); (---) não modulou significativamente a atividade enzimática; (na) = não analisado

A presença de *pools* bioreativos de cátions metálicos nos tecidos (WILLIAMS & FRAUSTO DA SILVA, 2000) sugere que as arginases, potencialmente, podem formar centro metálico não apenas com Mn^{2+} , mas também com outros cátions divalentes. Assim, a atividade argininolítica dos tecidos poderia ser influenciada pela biodisponibilidade de cátions metálicos. Estudo *in vivo* com *Helicobacter pylori*, crescendo em meio de cultura contendo Co^{2+} como único cátion metálico, mostrou que Co^{2+} foi capaz de ativar a ARG dessa bactéria *in vivo*, em nível expressivamente maior do que em meio contendo Mn^{2+} (MCGEE *et al.*, 2004).

Assim, os níveis relativamente elevados de Cu^{2+} e Cd^{2+} dos ecossistemas marinhos antárticos poder ter forçado a seleção de arginases ativadas por Cu^{2+} e mais resistentes à inibição por Cd^{2+} .

Tabela 4. Efeito de metais sobre a atividade argininolítica branquial de *Nacella concinna*. As atividades argininolíticas foram determinadas em sistemas de reação contendo cátion metálico 1 mmol/L^{-1} e dois cátions metálicos, cada um 1 mmol.L^{-1} . Atividade foi relativizada em função do controle (sem adição de cátions metálicos), ao qual foi atribuído o valor de 100%.

Cátions Metálicos	Mn^{2+}	Cu^{2+}	Co^{2+}	Ni^{2+}	Zn^{2+}	Fe^{3+}	Pb^{2+}	Hg^{2+}	Cd^{2+}
Mn^{2+}	↑	↑	↓	↓	↓	↓	---	↓↓	↓↓
Cu^{2+}		↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓↓	↓
Co^{2+}			↓	na	na	na	na	na	na
Ni^{2+}				---	na	na	na	na	na
Zn^{2+}					↓	na	na	na	na
Fe^{3+}						↓	na	na	na
Pb^{2+}							---	na	na
Hg^{2+}								↓↓	na
Cd^{2+}									↓↓

(↑) = grau de ativação em relação ao controle (uma seta em até 200%, duas setas entre 200% e 300%; três setas entre 300% e 400% e quatro setas entre 400% e 500%; cinco setas entre 500% e 600%); (↓) = grau de inibição em relação ao controle (uma seta em até 50% da atividade do controle; duas setas entre zero e 50% do controle); (---) não modulou significativamente a atividade enzimática; (na) = não analisado

Zn^{2+} e Fe^{3+} não modularam a atividade da ARG do pé muscular de *N. concinna*, e inibiram fracamente a ARG branquial. Esses dois cátions metálicos são conhecidos inibidores de arginases de moluscos. Zn^{2+} é capaz de inibir fortemente a ARG do gastrópode *Concholepas concholepas* (CARVAJAL *et al.*, 1984), e Zn^{2+} e Fe^{3+} são potentes inibidores da ARG do bivalve *D. polymorpha* (TORMANEN, 1997). O mecanismo de inibição das arginases por Fe^{3+} é desconhecido, mas Zn^{2+} forma um centro metálico trinuclear com dois Mn^{2+} (D'ANTONIO *et al.*, 2012). A inibição da ARG humana I por Zn^{2+} é competitiva em relação à L-arginina, a qual não é revertida pela adição de Mn^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+} (CARVAJAL *et al.*, 1995). Como a adição de Mn^{2+} não foi capaz de reverter a inibição das arginase do pé muscular e brânquias de *N.*

concinna por Zn^{2+} , a inibição é compatível com a formação de um centro metálico trinuclear. O Cu^{2+} também não foi capaz de ativar as arginases de *N. concinna* na presença de Zn^{2+} , sugerindo que Cu^{2+} deve exercer o seu efeito ativador através da formação de um centro metálico.

Cádmio, mercúrio e chumbo são metais não essenciais e tóxicos, mesmo em baixas concentrações. Potencialmente, esses metais podem deslocar ou substituir cofatores metálicos de enzimas, e comprometer as atividades de sistemas fisiológicos (TORRES *et al.*, 2008). O grau de inibição da ARG branquial de *N. concinna* por Hg^{2+} e Cd^{2+} foi semelhante ao das arginases do gastrópode *C. concholepas* (CARVAJAL *et al.*, 1984) e do bivalve *S. solida* (CARVAJAL *et al.*, 1994a). Todavia, a ARG do pé muscular de *N. concinna* mostrou maior resistência à inibição por Cd^{2+} e Hg^{2+} , semelhante à ARG renal do bivalve antártico *L. elliptica* (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Normalmente Cd^{2+} é um inibidor de arginases, mas substitui parcialmente o Mn^{2+} em algumas reações catalisadas por arginases (FUENTES *et al.*, 1994). Cd^{2+} aparece naturalmente elevado na fração fitoplancônica dos mares Antárticos, e sofre biomagnificação em níveis tróficos superiores (HONDA *et al.*, 1987). O nível de Cd^{2+} do rim do filtrador *L. elliptica* e pé muscular de *N. concinna* são cerca de duas ordens de grandeza maiores do que os níveis de Cd^{2+} presente no *pool* de tecidos moles do bivalve não antártico *D. polymorpha* (Tabela 2). No caso de *L. elliptica*, o tecido renal concentra a maior parte da atividade argininolítica, e o Cd^{2+} inibiu em apenas 26% a atividade da ARG (Tabela 1). Assim, a maior resistência das arginases de *N. concinna* à inibição por Cd^{2+} na presença de Cu^{2+} , sugere uma possível vantagem adaptativa na ocupação de nichos ricos em Cd^{2+} e Cu^{2+} .

O Hg^{2+} tem características de um poluente global, e tem sido apontado como um sério contaminante dos ecossistemas antárticos. O acúmulo de Hg^{2+} em líquens, invertebrados e no fígado de vertebrados tem chamado a atenção para os possíveis impactos desse metal sobre os ecossistemas marinhos costeiros da Antártica (RIVA *et al.*, 2004; BARGAGLI, 2008). Apesar da bioacumulação de Hg^{2+} nos tecidos de organismos Antárticos, a concentração nos sedimentos da Baía do Almirantado está próxima da concentração da crosta terrestre continental inferior (SANTOS *et al.*, 2006). O Hg^{2+} se mostrou um potente inibidor das arginases de brânquias e pé muscular de *N. concinna*, semelhante ao observado em estudo com a ARG hepática

de *Mexican axolotl* (PALACIOS *et al.*, 1969). A ação combinada com Mn^{2+} ou Cu^{2+} acentuou ainda mais a inibição por Hg^{2+} , mostrando que as arginases desse gastrópode são vulneráveis à ação deletéria desse metal pesado de origem antropogênica.

Já o Pb^{2+} é o mais comum dos metais não essenciais contaminante de solos, e representa uma ameaça para a saúde dos ecossistemas (CHAPMAN *et al.*, 2013), pois pode inibir a atividade de diversas enzimas, substituir impropriamente o Ca^{2+} em processos fisiológicos e induzir estresse oxidativo (SHARMA *et al.*, 2014). Apenas a ARG do pé muscular de *N. concinna* foi inibida pelo Pb^{2+} , mas a adição de Mn^{2+} aboliu essa inibição e ativou expressivamente a ARG. O efeito do Pb^{2+} sobre a atividade argininolítica tem sido pouco estudado. Esse cátion metálico foi capaz de inibir em 86% a atividade da ARG de *D. polymorpha* em pH 9,5, mas não foi capaz de alterar a atividade da ARG branquial de *N. concinna*. Os níveis de Pb^{2+} encontrado de sedimentos marinhos da Enseada Potter Cove e da Baía do Almirantado, ambas localizadas na Ilha Rei George, foram semelhantes aos valores da linha de base natural de diversas regiões não poluídas do planeta (ANDRADE *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2005).

6. CONCLUSÕES

- ✓ A glândula digestiva de *Nacella concinna* é capaz de prevenir lesões oxidativas no estresse termo-salino de curto prazo, o qual é naturalmente vivenciado por esse gastrópode durante o período de baixa mar, na zona entremarés da Antártica;
- ✓ O gastrópode *N. concinna* modula distintamente a sua defesa antioxidante em brânquias, pé muscular e glândula digestiva, basicamente elevando o potencial dismutador de superóxido e o potencial redox gerador de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ dos tecidos;
- ✓ O metabolismo energético branquial não é modulado no estresse térmico (4 °C) de curto prazo, mas a hipossalinidade é capaz de elevar o potencial aeróbio gerador de ATP, aumentando os níveis de CS e IDH;
- ✓ O aquecimento em 4 °C é capaz de elevar o potencial glicolítico do pé muscular, aumentando os níveis das enzimas HK, PFK e PK;
- ✓ O aumento dos níveis de GDH e AST no pé muscular no estresse hipossalino de curto prazo, sugere a participação dessas enzimas no controle osmótico desse tecido;
- ✓ O uso das respostas metabólicas de *N. concinna* como biomarcadoras devem ser vistas com cautela, pois apesar ter sido recomendado como biomonitor para contaminação por metais e HPAs, várias enzimas da defesa antioxidante e do metabolismo energético/nitrogenado, são moduladas também por aquecimento e hipossalinidade, bem como por interações entre esses fatores, condições vivenciadas diariamente no ambiente natural de *N. concinna*;
- ✓ A defesa antioxidante da glândula digestiva foi parcialmente eficaz em prevenir lesões oxidativas na exposição ao esgoto da EACF. O aumento dos níveis SOD, CAT e GST contribuíram para evitar a oxidação lipídica, mas não a carbonilação proteica na diluição de 0,05% (v/v);
- ✓ A exposição ao esgoto da EACF não foi capaz de modular a defesa antioxidante do pé muscular;
- ✓ O aumento dos níveis de G6PDH e ARG das brânquias pode ter relação com as necessidades regenerativas desse tecido, o qual ficou diretamente exposto à ação deletéria do esgoto, considerando que as enzimas G6PDH e ARG são essenciais para divisão celular e regeneração tecidual;

- ✓ Na exposição ao esgoto, as brânquias modularam positivamente o metabolismo aeróbio e anaeróbio, sugerindo o aumento da demanda energética desse tecido;
- ✓ O esgoto é capaz de elevar o potencial glicolítico no pé muscular de *N. concinna*, observado pelo aumento dos níveis de PFK e PK, duas enzimas reguladoras da via;
- ✓ Brânquias e pé muscular de *N. concinna* concentram as maiores atividades de ARG em relação ao *pool* dos demais tecidos. As arginases de ambos os tecidos estão principalmente localizadas no citosol, e apresentam propriedades cinéticas distintas em relação ao K_M e ativação/inibição por metais;
- ✓ O elevado potencial argininolítico das brânquias de *N. concinna*, em conexão com o metabolismo nitrogenado desse gastrópode, sugere que a ARG branquial pode ser a principal enzima responsável pelo controle sistêmico dos níveis de L-arginina;
- ✓ A ARG do pé muscular apresenta níveis e propriedades cinéticas adequadas para controlar os níveis de L-arginina do pé muscular desse gastrópode, considerando que os níveis de ODH são cerca de duas vezes menores do que os de ARG;
- ✓ O Cu^{2+} foi capaz de reverter parcialmente a inibição da ARG do pé muscular e das brânquias por Cd^{2+} , o que pode ter contribuído para *N. concinna* ocupar nichos ricos em Cu^{2+} e Cd^{2+} , no litoral da Península Antártica e Ilhas adjacentes;
- ✓ A ativação por Cu^{2+} é uma característica única das arginases de *N. concinna*. Contudo, o comportamento cinético das arginases de desse patelídeo não podem ser generalizado para todos os gastrópodes ou outros moluscos, e nem mesmo ao tipo de ambiente, pois pode ter relação com outros fatores, tais como o hábito alimentar e os mecanismos de defesa molecular das espécies, como por exemplo, a expressão de metalotioneínas e a formação de grânulos eletrodensos. O hábito raspador de biofilme do substrato expõe o gastrópode *N. concinna* a níveis mais elevados de Cu^{2+} presentes nos sedimentos marinhos antárticos. Assim, a presença de arginases ativadas por Cu^{2+} sugere uma possível microevolução que contribuiu para adaptação de *N. concinna* aos níveis naturalmente elevados de Cu^{2+} do litoral da Península Antártica e Ilhas adjacentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELE, D.; BURLANDO, B.; VIARENGO, A.; PORTNER, H. O. Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 120, n. 2, p. 425-435. 1998.

ABELE, D.; FERREYRA, G. A.; SCHLOSS, I. H₂O₂ accumulation from photochemical production and atmospheric wet deposition in Antarctic coastal and off-shore waters of Potter Cove, King George Island, South Shetland Islands. **Antarctic Science**, Oxford, v. 11, n. 02, p. 131-139. 1999.

ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 138, n. 4, p. 405-415. 2004.

ABELE, D.; TESCH, C.; WENCKE, P.; PÖRTNER, H. O. How does oxidative stress relate to thermal tolerance in the Antarctic bivalve *Yoldia eightsi*? **Antarctic Science**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 111-118. 2001.

AGHMICH, A.; TABOADA, S.; TOLL, L.; BALLESTEROS, M. First assessment of the rocky intertidal communities of Fildes Bay, King George Island (South Shetland Islands, Antarctica). **Polar Biology**, New York, v. 39, n. 1, p. 189-198. 2016.

AHN, I.-Y.; CHUNG, K. H.; CHOI, H. J. Influence of glacial runoff on baseline metal accumulation in the Antarctic limpet *Nacella concinna* from King George Island. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 49, n. 1-2, p. 119-127. 2004.

AHN, I.-Y.; KIM, K.-W.; CHOI, H. J. A baseline study on metal concentrations in the Antarctic limpet *Nacella concinna* (Gastropoda: Patellidae) on King George Island: variations with sex and body parts. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 44, n. 5, p. 424-431. 2002.

AHN, I.-Y.; LEE, S. H.; KIM, K. T.; SHIM, J. H.; KIM, D.-Y. Baseline heavy metal concentrations in the Antarctic clam, *Laternula elliptica* in Maxwell Bay, King George Island, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 32, n. 8-9, p. 592-598. 1996.

AKAISHI, F. M.; ST-JEAN, S. D.; BISHAY, F.; CLARKE, J.; RABITTO, I. D. S.; RIBEIRO, C. A. D. O. Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 82, n. 1, p. 1-14. 2007.

ALCARAZ, C.; CAIOLA, N.; IBÁÑEZ, C. Bioaccumulation of pollutants in the zebra mussel from hazardous industrial waste and evaluation of spatial distribution using GAMs. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 409, n. 5, p. 898-904. 2011.

ALLISON, I.; ALLEY, R. B.; FRICKER, H. A.; THOMAS, R. H.; WARNER, R. C. Ice sheet mass balance and sea level. **Antarctic Science**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 413-426. 2009.

ALVES, G. G.; MARINHO-CARVALHO, M. M.; ATELLA, G. C.; SILVA-NETO, M. A. C.; SOLA-PENNA, M. Allosteric regulation of 6-phosphofructo-1-kinase activity of fat body and flight muscle from the bloodsucking bug *Rhodnius prolixus*. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 1, p. 53-62. 2007.

AMINLARI, M.; VASEGHI, T. Arginase distribution in tissues of domestic animals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 103, n. 2, p. 385-389. 1992.

AN, M. I.; CHOI, C. Y. Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: Effects on hemolymph and biochemical parameters. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 155, n. 1, p. 34-42. 2010.

ANDRADE, S.; POBLET, A.; SCAGLIOLA, M.; VODOPIVEZ, C.; CURTOSI, A.; PUCCI, A.; MARCOVECCHIO, J. Distribution of heavy metals in surface sediments from an antarctic marine ecosystem. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 66, n. 2, p. 147-158. 2001.

ANDREWS, T. R.; REID, R. G. B. Ornithine cycle and uricolytic enzymes in four bivalve molluscs. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 475-491. 1972.

ANSALDO, M.; NAJLE, R.; LUQUET, C. M. Oxidative stress generated by diesel seawater contamination in the digestive gland of the Antarctic limpet *Nacella concinna*. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 59, n. 4, p. 381-390. 2005.

ANSALDO, M.; SACRISTÁN, H.; WIDER, E. Does starvation influence the antioxidant status of the digestive gland of *Nacella concinna* in experimental conditions? **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, Oxford, v. 146, n. 1-2, p. 118-123. 2007.

ARIGONY-NETO, J.; SIMÕES, J. C.; BREMER, U. F. Implementation of the Admiralty Bay Geographic Information System, King George Island, Antarctica. . **Pesquisa Antártica Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 4, p. 187-190. 2004.

ARONSON, R. B.; THATJE, S.; MCCLINTOCK, J. B.; HUGHES, K. A. Anthropogenic impacts on marine ecosystems in Antarctica. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1223, n. 1, p. 82-107. 2011.

BALDWIN, J.; ELIAS, J. P.; WELLS, R. M. G.; DONOVAN, D. A. Energy metabolism in the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné: Comparisons with temperate abalone species. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 342, n. 2, p. 213-225. 2007.

BALLANTYNE, J. S. Jaws: The inside story. The metabolism of elasmobranch fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 118, n. 4, p. 703-742. 1997.

BARGAGLI, R. Environmental contamination in Antarctic ecosystems. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 400, n. 1-3, p. 212-226. 2008.

BARKER, P. F.; DIEKMANN, B.; ESCUTIA, C. Onset of Cenozoic Antarctic glaciation. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, Amsterdam, v. 54, n. 21-22, p. 2293-2307. 2007.

BARNES, D. K. A.; BROCKINGTON, S. Zoobenthic biodiversity, biomass and abundance at Adelaide Island, Antarctica. **Marine Ecology Progress Series**, Amelinghausen, v. 249, p. 145-155. 2003.

BARRETT, P. Palaeoclimatology: Cooling a continent. **Nature**, London, v. 421, n. 6920, p. 221-223. 2003.

BARTBERGER, C. A.; JR., S. K. P. Relationship between ammonia excretion rates and hemolymph nitrogenous compounds of a euryhaline bivalve during low salinity acclimation. **The Biological Bulletin**, Chicago, v. 150, n. 1, p. 1-14. 1976.

BASHEVKIN, S. M.; PECHENIK, J. A. The interactive influence of temperature and salinity on larval and juvenile growth in the gastropod *Crepidula fornicata* (L.). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 470, p. 78-91. 2015.

BEAUMONT, A. R.; WEI, J. H. C. Morphological and genetic variation in the Antarctic limpet *Nacella concinna* (Strebel, 1908). **Journal of Molluscan Studies**, Oxford, v. 57, n. 4, p. 443-450. 1991.

BELL, R. A. V.; DAWSON, N. J.; STOREY, K. B. Insights into the in vivo regulation of glutamate dehydrogenase from the foot muscle of an estivating land snail. **Enzyme Research**, New York, v. 2012, p. 1-10. 2012.

BELLÉ, N. A. V.; DALMOLIN, G. D.; FONINI, G.; RUBIN, M. A.; ROCHA, J. B. T. Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1008, n. 2, p. 245-251. 2004.

BERGAYOU, H.; MOUNEYRAC, C.; PELLERIN, J.; MOUKRIM, A. Oxidative stress responses in bivalves (*Scrobicularia plana*, *Cerastoderma edule*) from the Oued Souss estuary (Morocco). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 72, n. 3, p. 765-769. 2009.

BERGMEYER, H. U. Determination of the catalytic activity of enzymes. In: BERGMEYER, H. U.; BERGMEYER, J. & GRABL, M. (Ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. Weinheim: Verlag Chemie, v.I, 1983a, p.573.

BERGMEYER, H. U. Standardization in Enzymatic Analysis. In: BERGMEYER, H. U.; BERGMEYER, J. & GRABL, M. (Ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. Weinheim: Verlag Chemie, v.I, cap. 1, 1983b, p.573.

BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? **Metabolism**, Naples, v. 49, n. 2, Supplement 1, p. 3-8. 2000.

BICK, A.; ARLT, G. Description of intertidal macro- and meiobenthic assemblages in Maxwell Bay, King George Island, South Shetland Islands, Southern Ocean. **Polar Biology**, New York, v. 36, n. 5, p. 673-689. 2013.

BINELLI, A.; MAGNI, S.; SOAVE, C.; MARAZZI, F.; ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; PAROLINI, M.; MEZZANOTTE, V. The biofiltration process by the bivalve *D. polymorpha* for the removal of some pharmaceuticals and drugs of abuse from civil wastewaters. **Ecological Engineering**, Oxford, v. 71, n. 0, p. 710-721. 2014.

BINELLI, A.; PAROLINI, M.; PEDRIALI, A.; PROVINI, A. Antioxidant Activity in the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*) in Response to Triclosan Exposure. **Water, Air, & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 217, n. 1-4, p. 421-430. 2011.

BISCHOF, K.; HANELT, D.; WIENCKE, C. UV-radiation can affect depth-zonation of Antarctic macroalgae. **Marine Biology**, Berlin, v. 131, n. 4, p. 597-605. 1998.

BISHOP, S. H.; ELLIS, L. L.; BURCHAM, J. M. Amino Acid Metabolism in Molluscs. In: HOCHACHKA, P. W. (Ed.). **The Mollusca: Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics**. San Diego: Academic Press, v.1, 1983, p.243-327.

BORKOVIC, S. S.; PAVLOVIC, S. Z.; KOVACEVIC, T. B.; STAJN, A. Å.; PETROVIC, V. M.; SAICIC, Z. S. Antioxidant defence enzyme activities in hepatopancreas, gills and muscle of Spiny cheek crayfish (*Orconectes limosus*) from the River Danube. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, Oxford, v. 147, n. 1, p. 122-128. 2008.

BOUTET, I.; MEISTERTZHEIM, A.-L.; TANGUY, A.; THÉBAULT, M.-T.; MORAGA, D. Molecular characterization and expression of the gene encoding aspartate aminotransferase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to environmental stressors. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, New York, v. 140, n. 1, p. 69-78. 2005.

BOWDEN, D. A. Quantitative characterization of shallow marine benthic assemblages at Ryder Bay, Adelaide Island, Antarctica. **Marine Biology**, Berlin, v. 146, n. 6, p. 1235-1249. 2005.

BRACONI, D.; BERNARDINI, G.; SANTUCCI, A. Linking protein oxidation to environmental pollutants: Redox proteomic approaches. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 74, n. 11, p. 2324-2337. 2011.

BRANDT, A.; DE BROYER, C.; DE MESEL, I.; ELLINGSEN, K. E.; GOODAY, A. J.; HILBIG, B.; LINSE, K.; THOMSON, M. R. A.; TYLER, P. A. The biodiversity of the deep Southern Ocean benthos. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 362, n. 1477, p. 39-66. 2007.

BRAUN, M.; SIMÕES, J. C.; VOGT, S.; BREMER, U. F.; BLINDOW, N.; PFENDER, M.; SAURER, H.; AQUINO, F. E.; FERRON, F. A. An improved topographic

database for King George Island: compilation, application and outlook. **Antarctic Science**, Oxford, v. 13, n. 01, p. 41-52. 2001.

BRÊTHES, J. C.; FERREYRA, G.; VEGA, S. Distribution, growth and reproduction of the limpet *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel 1908) in relation to potential food availability, in Esperanza Bay (Antarctic Peninsula). **Polar Biology**, New York, v. 14, n. 3, p. 161-170. 1994.

BROMAN, T.; BERGSTRÖM, S.; ON, S. L. W.; PALMGREN, H.; MCCAFFERTY, D. J.; SELLIN, M.; OLSEN, B. Isolation and Characterization of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* from Macaroni Penguins (*Eudyptes chrysolophus*) in the Subantarctic Region. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 1, p. 449-452. 2000.

BRUNI, V.; MAUGERI, T. L.; MONTICELLI, L. Faecal pollution indicators in the Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 34, n. 11, p. 908-912. 1997.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. Second. Philadelphia: Saunders Company, 2326. 1994.

BUSTAMANTE, M.; TAJADURA-MARTÍN, F. J.; SAIZ-SALINAS, J. I. Temporal and spatial variability on rocky intertidal macrofaunal assemblages affected by an oil spill (Basque coast, northern Spain). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, Plymouth, v. 90, n. 07, p. 1305-1317. 2010.

BUTTERWORTH, P. J. Different kinds of enzyme determination. In: BERGMAYER, H. U.; BERGMAYER, J. & GRABL, M. (Ed.). **Methods of enzymatic analysis - Enzymes 1: oxidoreductases, transferases**. Weinheim: Verlag Chemie, v. III, cap. 1, 1983, p. 605.

CADÉE, G. C. Shell damage and shell repair in the Antarctic limpet *Nacella concinna* from King George Island. **Journal of Sea Research**, Texel, v. 41, n. 1-2, p. 149-161. 1999.

CALABRESE, E. J. Paradigm lost, paradigm found: The re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. **Environmental Pollution**, Barking, v. 138, n. 3, p. 378-411. 2005.

CAMPBELL, J. W. A comparative study of molluscan and mammalian arginases. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 179-199. 1966.

CAMPOS, D. Y. F. **Análise das respostas citogenotóxicas e histopatológicas do peixe *Trematomus newnesi* exposto à água do mar diante da Estação Antártica Brasileira "Comandante Ferraz", Ilha Rei George, Antártica**. 97 (Mestrado). Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2007

CANESI, L. Pro-oxidant and antioxidant processes in aquatic invertebrates. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1340, n. 1, p. 1-7. 2015.

CARVAJAL, N.; BUSTAMANTE, M.; HINRICHSEN, P.; TORRES, A. Properties of arginase from the sea mollusc *Concholepas concholepas*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 78, n. 3, p. 591-594. 1984.

CARVAJAL, N.; KESSI, E.; BIDART, J.; ROJAS, A. Properties of arginase from the foot muscle of *Chiton latus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 90, n. 2, p. 385-388. 1988.

CARVAJAL, N.; TORRES, C.; URIBE, E.; SALAS, M. Interaction of arginase with metal ions: studies of the enzyme from human liver and comparison with other arginases. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 112, n. 1, p. 153-159. 1995.

CARVAJAL, N.; URIBE, E.; TORRES, C. Subcellular localization, metal ion requirement and kinetic properties of arginase from the gill tissue of the bivalve *Semele solida*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 109, n. 4, p. 683-689. 1994a.

CARVAJAL, N.; VEGA, E.; ERICES, A.; BUSTOS, D.; TORRES, C. Lactate dehydrogenase, alanopine dehydrogenase and octopine dehydrogenase from the heart of *Concholepas concholepas* (Gastropoda: Muricidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 108, n. 4, p. 543-550. 1994b.

CASEY, C. A.; ANDERSON, P. M. Subcellular location of glutamine synthetase and urea cycle enzymes in liver of spiny dogfish (*Squalus acanthias*). **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 257, n. 14, p. 8449-8453. 1982.

CHAPMAN, E. E. V.; DAVE, G.; MURIMBOH, J. D. A review of metal (Pb and Zn) sensitive and pH tolerant bioassay organisms for risk screening of metal-contaminated acidic soils. **Environmental Pollution**, Barking, v. 179, p. 326-342. 2013.

CHENG, S.-Y.; LEE, W.-C.; CHEN, J.-C. Increase of uricogenesis in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* reared under hyper-osmotic conditions. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 138, n. 3, p. 245-253. 2004.

CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, Berlin, v. 52, n. 3, p. 273-283. 1979.

CHINARD, F. P. Photometric estimation of proline and ornithine. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 199, p. 91-95. 1952.

CHOY, E. J.; PARK, H.; KIM, J.-H.; AHN, I.-Y.; KANG, C.-K. Isotopic shift for defining habitat exploitation by the Antarctic limpet *Nacella concinna* from rocky coastal habitats (Marian Cove, King George Island). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, v. 92, n. 3, p. 339-346. 2011.

CHRISTIANSON, D. W.; COX, J. D. Catalysis by metal-activated hydroxide in zinc and manganese metalloenzymes. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 68, p. 33-57. 1999.

CHWEDORZEWSKA, K.; KORCZAK, M. Human impact upon the environment in the vicinity of Arctowski Station, King George Island, Antarctica. **Polish Polar Research**, Łódź, v. 31, n. 1, p. 45-60. 2010.

CHWEDORZEWSKA, K. J.; KORCZAK, M.; BEDNAREK, P. T.; MARKOWSKA-POTOCKA, M. Low genetic differentiation between two morphotypes of the gastropod *Nacella concinna* from Admiralty Bay, Antarctica. **Polish Polar Research**, Łódź, v. 31, n. 2, p. 195-200. 2010.

CIARDIELLO, A. M.; CAMARDELLA, L.; DI PRISCO, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the blood cells of two Antarctic teleosts: Correlation with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, Amsterdam, v. 1250, n. 1, p. 76-82. 1995.

CIARDIELLO, M. A.; CAMARDELLA, L.; CARRATORE, V.; DI PRISCO, G. Enzymes in Antarctic fish: Glucose-6-phosphate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, New York, v. 118, n. 4, p. 1031-1036. 1997.

CIARDIELLO, M. A.; CAMARDELLA, L.; CARRATORE, V.; DI PRISCO, G. L-Glutamate dehydrogenase from the Antarctic fish *Chaenocephalus aceratus*: Primary structure, function and thermodynamic characterisation: relationship with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, Amsterdam, v. 1543, n. 1, p. 11-23. 2000.

CIARDIELLO, M. A.; SCHMITT, B.; DI PRISCO, G.; HERVÉ, G. Influence of hydrostatic pressure on L-glutamate dehydrogenase from the Antarctic fish *Chaenocephalus aceratus*. **Marine Biology**, Berlin, v. 134, n. 4, p. 631-636. 1999.

CINCINELLI, A.; MARTELLINI, T.; POZO, K.; KUKUČKA, P.; AUDY, O.; CORSOLINI, S. *Trematomus bernacchii* as an indicator of POP temporal trend in the Antarctic seawaters. **Environmental Pollution**, Barking, 2016.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 48, n. 6, p. 749-762. 2010.

CLARIDGE, G. G. C.; CAMPBELL, I. B.; POWELL, H. K. J.; AMIN, Z. H.; BALKS, M. R. Heavy metal contamination in some soils of the McMurdo Sound region, Antarctica. **Antarctic Science**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 9-14. 1995.

CLARK, G. F.; RAYMOND, B.; RIDDLE, M. J.; STARK, J. S.; JOHNSTON, E. L. Vulnerability of Antarctic shallow invertebrate-dominated ecosystems. **Austral Ecology**, Carlton, v. 40, n. 4, p. 482-491. 2015.

CLARK, M. S.; GEISSLER, P.; WALLER, C.; FRASER, K. P. P.; BARNES, D. K. A.; PECK, L. S. Low heat shock thresholds in wild Antarctic inter-tidal limpets (*Nacella concinna*). **Cell Stress Chaperones**, Berlin, v. 13, n. 1, p. 51-58. 2008.

CLARKE, A. Faecal production and an estimate of food intake in the wild of the Antarctic limpet *Nacella concinna* (Strebel). **Journal of Molluscan Studies**, Oxford, v. 55, n. 2, p. 261-262. 1989.

CLARKE, A. Costs and consequences of evolutionary temperature adaptation. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 18, n. 11, p. 573-581. 2003.

CLARKE, A.; ARNTZ, W. E. An introduction to EASIZ (Ecology of the Antarctic Sea Ice Zone): An integrated programme of water column, benthos and benthic-pelagic coupling in the coastal environment of Antarctica. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, Oxford, v. 53, n. 8-10, p. 803-814. 2006.

CLARKE, A.; BARNES, D. K. A.; HODGSON, D. A. How isolated is Antarctica? **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 20, n. 1, p. 1-3. 2005.

CLARKE, A.; JOHNSTON, I. A. Evolution and adaptive radiation of antarctic fishes. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 5, p. 212-218. 1996.

CLARKE, A.; JOHNSTON, N. M.; MURPHY, E. J.; ROGERS, A. D. Introduction. Antarctic ecology from genes to ecosystems: The impact of climate change and the importance of scale. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 362, n. 1477, p. 5-9. 2007.

COCHÓN, A. C.; DELLA PENNA, A. B.; KRISTOFF, G.; PIOL, M. N.; SAN MARTÍN DE VIALE, L. C.; VERRENGIA GUERRERO, N. R. Differential effects of paraquat on oxidative stress parameters and polyamine levels in two freshwater invertebrates. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 68, n. 2, p. 286-292. 2007.

COETZEE, B. W. T.; CHOWN, S. L. A meta-analysis of human disturbance impacts on Antarctic wildlife. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 91, n. 3, p. 578-596. 2016.

COHEN, H. K. **Handbook of the Antarctic Treaty**. Washington: United States Department of State, Under Secretary for Democracy and Global Affairs, Bureau of Oceans and International Environmental and Scientific Affairs Report, 993. 2002.

COLABUONO, F. I.; VANDER POL, S. S.; HUNCIK, K. M.; TANIGUCHI, S.; PETRY, M. V.; KUCKLICK, J. R.; MONTONE, R. C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. **Environmental Pollution**, Barking, v. 216, p. 38-45. 2016.

COMOGLIO, L.; AMIN, O.; BOTTÉ, S.; MARCOVECCHIO, J. Use of biomarkers in resident organisms as a tool for environmental monitoring in a cold coastal system, Tierra del Fuego Island. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 74, n. 3, p. 382-393. 2011.

CORBETT, P. A.; KING, C. K.; STARK, J. S.; MONDON, J. A. Direct evidence of histopathological impacts of wastewater discharge on resident Antarctic fish

(*Trematomus bernacchii*) at Davis Station, East Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 87, n. 1–2, p. 48–56. 2014.

CORSOLINI, S. Industrial contaminants in Antarctic biota. **Journal of Chromatography A**, Maryland Heights, v. 1216, n. 3, p. 598–612. 2009.

CROCKETT, E. L.; SIDELL, B. D. Some pathways of energy metabolism are cold adapted in Antarctic fishes. **Physiological Zoology**, Chicago, v. 63, n. 3, p. 472–488. 1990.

CUKLEV, F.; GUNNARSSON, L.; CVIJOVIC, M.; KRISTIANSSON, E.; RUTGERSSON, C.; BJÖRLENIUS, B.; LARSSON, D. G. J. Global hepatic gene expression in rainbow trout exposed to sewage effluents: A comparison of different sewage treatment technologies. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 427–428, n. 0, p. 106–114. 2012.

CURTOSI, A.; PELLETIER, E.; VODOPIVEZ, C.; ST LOUIS, R.; MAC CORMACK, W. P. Presence and distribution of persistent toxic substances in sediments and marine organisms of Potter Cove, Antarctica. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 59, n. 4, p. 582–592. 2010.

CURTOSI, A.; PELLETIER, E.; VODOPIVEZ, C. L.; MAC CORMACK, W. P. Distribution of PAHs in the water column, sediments and biota of Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica. **Antarctic Science**, Oxford, v. 21, n. 04, p. 329–339. 2009.

CVANCARA, V. A. Studies on tissue arginase and ureogenesis in fresh-water teleosts. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 489–496. 1969.

D'ANTONIO, E. L.; HAI, Y.; CHRISTIANSON, D. W. Structure and function of non-native metal clusters in human Arginase I. **Biochemistry**, Washington, v. 51, n. 42, p. 8399–8409. 2012.

DALLINGER, R.; BERGER, B.; HUNZIGER, P.; KGI, J. H. R. Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. **Nature**, London, v. 388, n. 6639, p. 237–238. 1997.

DAVENPORT, J. Comparisons of the biology of the intertidal subantarctic limpets *Nacella concinna* and *Kerguelenella lateralis*. **Journal of Molluscan Studies**, Oxford, v. 63, n. 1, p. 39–48. 1997.

DAVENPORT, J. Meltwater effects on intertidal Antarctic limpets, *Nacella concinna*. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, Plymouth, v. 81, n. 4, p. 643–649. 2001.

DECONTO, R. M.; POLLARD, D. Rapid Cenozoic glaciation of Antarctica induced by declining atmospheric CO₂. **Nature**, London, v. 421, n. 6920, p. 245–249. 2003.

DIENI, C. A.; STOREY, K. B. Regulation of hexokinase by reversible phosphorylation in skeletal muscle of a freeze-tolerant frog. **Comparative Biochemistry and**

Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 159, n. 4, p. 236-243. 2011.

DIERSEN, H. M.; SMITH, R. C.; VERNET, M. Glacial meltwater dynamics in coastal waters west of the Antarctic peninsula. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 4, p. 1790-1795. 2002.

DUNN, J. F.; JOHNSTON, I. A. Metabolic constraints on burst-swimming in the Antarctic teleost *Notothenia neglecta*. **Marine Biology**, Berlin, v. 91, n. 4, p. 433-440. 1986.

DUQUESNE, S.; RIDDLE, M. Biological monitoring of heavy-metal contamination in coastal waters off Casey Station, Windmill Islands, East Antarctica. **Polar Biology**, New York, v. 25, n. 3, p. 206-215. 2002.

ESTEVEZ, M. S.; MALANGA, G.; PUNTARULO, S. UV-B effects on Antarctic *Chlorella* sp cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 62, n. 1-2, p. 19-25. 2001.

FARRENY, R.; OLIVER-SOLÀ, J.; LAMERS, M.; AMELUNG, B.; GABARRELL, X.; RIERADEVALL, J.; BOADA, M.; BENAYAS, J. Carbon dioxide emissions of Antarctic tourism. **Antarctic Science**, Oxford, v. 23, n. 06, p. 556-566. 2011.

FAVERO, M.; SILVA, M. P. How important are pelagic preys for the kelp gull during chick-rearing at the South Shetland Islands? **Polar Biology**, New York, v. 19, n. 1, p. 32-36. 1998.

FAVERO, M.; SILVA, P.; FERREYRA, G. Trophic relationships between the kelp gull and the Antarctic limpet at King George Island (South Shetland Islands, Antarctica) during the breeding season. **Polar Biology**, New York, v. 17, n. 5, p. 431-436. 1997.

FEIJÓ DE OLIVEIRA, M. **Resposta biológica do gastrópode antártico *Nacella concinna* (Strebel 1908) ao óleo diesel como possível biomarcador de impacto ambiental na zona entre marés**. 119 Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2013

FEIJÓ DE OLIVEIRA, M.; RODRIGUES JÚNIOR, E.; SUDA, C. N. K.; VANI, G. S.; DONATTI, L.; RODRIGUES, E.; LAVRADO, H. P. Interactions of temperature, salinity and diesel oil on antioxidant defense enzymes of the limpet *Nacella concinna*. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 97, n. 1-2, p. 451-459. 2015.

FERREIRA, M.; MORADAS-FERREIRA, P.; REIS-HENRIQUES, M. A. The effect of long-term depuration on levels of oxidative stress biomarkers in mullets (*Mugil cephalus*) chronically exposed to contaminants. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 64, n. 2, p. 181-190. 2007.

FERRON, F. A.; SIMÕES, J. C.; AQUINO, F. E.; SETZER, A. W. Air temperature time series for King George Island, Antarctica. **Pesquisa Antártica Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 4, p. 155-169. 2004.

FRANCO, R.; SÁNCHEZ-OLEA, R.; REYES-REYES, E. M.; PANAYIOTIDIS, M. I. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 674, n. 1–2, p. 3–22. 2009.

FRASER, K. P. P.; CLARKE, A.; PECK, L. S. Feast and famine in Antarctica: Seasonal physiology in the limpet *Nacella concinna*. **Marine Ecology Progress Series**, Amelinghausen, v. 242, p. 169–177. 2002.

FREEMAN, N. M.; LOVENDUSKI, N. S.; GENT, P. R. Temporal variability in the Antarctic Polar Front (2002–2014). **Journal of Geophysical Research: Oceans**, Hoboken, v. 121, n. 10, p. 7263–7276. 2016.

FRENOT, Y.; CHOWN, S. L.; WHINAM, J.; SELKIRK, P. M.; CONVEY, P.; SKOTNICKI, M.; BERGSTROM, D. M. Biological invasions in the Antarctic: Extent, impacts and implications. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, Cambridge, v. 80, n. 1, p. 45–72. 2005.

FRITZ, J. J.; NEALE, P. J.; DAVIS, R. F.; PELOQUIN, J. A. Response of Antarctic phytoplankton to solar UVR exposure: Inhibition and recovery of photosynthesis in coastal and pelagic assemblages. **Marine Ecology Progress Series**, Amelinghausen, v. 365, p. 1–16. 2008.

FUENTES, J. M.; CAMPO, M. L.; SOLER, G. Kinetics of manganese reconstitution and thiol group exposition in dialyzed rat mammary gland arginase. **International Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 26, n. 5, p. 653–659. 1994.

GASTON, S.; CAMPBELL, J. W. Distribution of arginase activity in mollusks. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 259–270. 1966.

GEORLETTE, D.; BLAISE, V.; COLLINS, T.; D'AMICO, S.; GRATIA, E.; HOYOUX, A.; MARX, J. C.; SONAN, G.; FELLER, G.; GERDAY, C. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 28, n. 1, p. 25–42. 2004.

GEORLETTE, D.; DAMIEN, B.; BLAISE, V.; DEPIEREUX, E.; UVERSKY, V. N.; GERDAY, C.; FELLER, G. Structural and functional adaptations to extreme temperatures in psychrophilic, mesophilic, and thermophilic DNA ligases. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 39, p. 37015–37023. 2003.

GHOSH, R.; LOKMAN, P. M.; LAMARE, M. D.; METCALF, V. J.; BURRITT, D. J.; DAVISON, W.; HAGEMAN, K. J. Changes in physiological responses of an Antarctic fish, the emerald rock cod (*Trematomus bernacchii*), following exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 128–129, n. 0, p. 91–100. 2013.

GOMES, V.; PASSOS, M. J. D. A. C. R.; ROCHA, A. J. D. S.; SANTOS, T. D. C. A. D.; MACHADO, A. S. D.; NGAN, P. V. Metabolic rates of the antarctic amphipod *Gondogeneia antarctica* at different temperatures and salinities. **Brazilian Journal of Oceanography**, São Paulo, v. 61, p. 243–249. 2013.

GONZÁLEZ, P. M.; PUNTARULO, S. Fe, oxidative and nitrosative metabolism in the Antarctic limpet *Nacella concinna*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 200, p. 56-63. 2016.

GRABICOVA, K.; LINDBERG, R. H.; ÖSTMAN, M.; GRABIC, R.; RANDAK, T.; JOAKIM LARSSON, D. G.; FICK, J. Tissue-specific bioconcentration of antidepressants in fish exposed to effluent from a municipal sewage treatment plant. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 488–489, n. 0, p. 46-50. 2014.

GRAZIANO, G. On the mechanism of cold denaturation. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v. 16, n. 39, p. 21755-21767. 2014.

GRIESHABER, M. K.; HARDEWIG, I.; KREUTZER, U.; PÖRTNER, H.-O. Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. In: (Ed.). **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 125**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1994, p.43-147.

GRIFFITHS, H. J. Antarctic marine biodiversity - what do we know about the distribution of life in the southern ocean? **PLoS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 8, 2010.

GRÖNDAHL, F.; SIDENMARK, J.; THOMSEN, A. Survey of waste water disposal practices at Antarctic research stations. **Polar Research**, Tromsø, v. 28, n. 2, p. 298-306. 2009.

GUERIN, J. L.; STICKLE, W. B. Effect of salinity on survival and bioenergetics of juvenile lesser blue crabs, *Callinectes similis*. **Marine Biology**, Berlin, v. 129, n. 1, p. 63-69. 1997.

GUERRA, R.; FETTER, E.; CESCHIM, L. M. M.; MARTINS, C. C. Trace metals in sediment cores from Deception and Penguin Islands (South Shetland Islands, Antarctica). **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 62, n. 11, p. 2571-2575. 2011.

HALL, L. W.; ANDERSON, R. D. The influence of salinity on the toxicity of various classes of chemicals to aquatic biota. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 25, n. 4, p. 281-346. 1995.

HANLON, D. P. The distribution of arginase and urease in marine invertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, New York, v. 52, n. 2, p. 261-264. 1975.

HARCET, M.; PERINA, D.; PLEŠE, B. Opine dehydrogenases in marine invertebrates. **Biochemical Genetics**, New York, v. 51, n. 9, p. 666-676. 2013.

HARGENS, A. R.; SHABICA, S. V. Protection against lethal freezing temperatures by mucus in an antarctic limpet. **Cryobiology**, San Diego, v. 10, n. 4, p. 331-337. 1973.

HAWES, T. C.; WORLAND, M. R.; BALE, J. S. Freezing in the Antarctic limpet, *Nacella concinna*. **Cryobiology**, San Diego, v. 61, n. 1, p. 128-132. 2010.

HEISE, K.; PUNTARULO, S.; PÖRTNER, H. O.; ABELE, D. Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*

(King and Broderip) under heat stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, New York, v. 134, n. 1, p. 79-90. 2003.

HELLER, J. Patellogastropoda: Limpets. In: (Ed.). **Sea Snails: A natural history**. Cham: Springer International Publishing, 2015, p.37-53.

HELLOU, J.; ROSS, N.; MOON, T. Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. **Environmental Science and Pollution Research**, Berlin, v. 19, n. 6, p. 2007-2023. 2012.

HERNANDEZ, J.; PRADO, V.; TORRES, D.; WALDENSTRÖM, J.; HAEMIG, P. D.; OLSEN, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Antarctic fur seals *Arctocephalus gazella*. **Polar Biology**, New York, v. 30, n. 10, p. 1227-1229. 2007.

HEUGENS, E. H. W.; HENDRIKS, A. J.; DEKKER, T.; STRAALLEN, N. M. V.; ADMIRAAL, W. A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 31, n. 3, p. 247-284. 2001.

HIRD, F. J. R. The importance of arginine in evolution. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, Oxford, v. 85, n. 2, p. 285-288. 1986.

HIRSCH-KOLB, H.; KOLB, H. J.; GREENBERG, D. M. Nuclear magnetic resonance studies of manganese binding of rat liver arginase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 246, n. 2, p. 395-401. 1971.

HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. **Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution**. New York: Oxford University Press, 466. 2002.

HOFFMAN, J.; PECK, L.; HILLYARD, G.; ZIERITZ, A.; CLARK, M. No evidence for genetic differentiation between Antarctic limpet *Nacella concinna* morphotypes. **Marine Biology**, Berlin, v. 157, n. 4, p. 765-778. 2010.

HONDA, K.; YAMAMOTO, Y.; TATSUKAWA, R. Distribution of heavy metals in Antarctic marine ecosystem (Ninth Symposium on Polar Biology). **Proceedings of the NIPR Symposium on Polar Biology**, Chiyoda-ku, Tokyo, v. 1, p. 184-197. 1987.

HUGHES, K. A.; LAWLEY, B.; NEWSHAM, K. K. Solar UV-B radiation inhibits the growth of antarctic terrestrial fungi **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 3, p. 1488-1491. 2003.

HUGHES, K. A.; PERTIERRA, L. R.; WALTON, D. W. H. Area protection in Antarctica: How can conservation and scientific research goals be managed compatibly? **Environmental Science & Policy**, Exeter, v. 31, p. 120-132. 2013.

HUGHES, K. A.; THOMPSON, A. Distribution of sewage pollution around a maritime Antarctic research station indicated by faecal coliforms, *Clostridium perfringens* and

faecal sterol markers. **Environmental Pollution**, Barking, v. 127, n. 3, p. 315-321. 2004.

HUS-CITHAREL, A.; LEVILLAIN, O. Identification of two arginase isoenzyme activities along the nephron of *Meriones shawi*. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, Berlin, v. 437, n. 3, p. 423-431. 1999.

IAATO. International Association of Antarctica Tour Operators <http://www.IAATO.org>, Data de acesso: 01 Agosto/2016. 2016.

IBARGUREN, I.; DIAZ-ENRICH, M. J.; CAO, J. S.; FERNANDEZ, M.; BARCIA, R.; VILLAMARIN, J. A.; RAMOS-MARTINEZ, J. N. I. Regulation of the futile cycle of fructose phosphate in sea mussel. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 126, n. 4, p. 495-501. 2000.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Modulation of cellular function by polyamines. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 39-51. 2010.

JANECKI, T.; KIDAWA, A.; POTOCKA, M. The effects of temperature and salinity on vital biological functions of the Antarctic crustacean *Serolis polita*. **Polar Biology**, Berlin, v. 33, n. 8, p. 1013-1020. 2010.

JENKINSON, C. P.; GRIGOR, M. R. Rat mammary arginase: Isolation and characterization. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, Orlando, v. 51, n. 2, p. 156-165. 1994.

JENKINSON, C. P.; GRODY, W. W.; CEDERBAUM, S. D. Comparative properties of arginases. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 114, n. 1, p. 107-132. 1996.

JIANG, Z.-Y.; WOOLLARD, A.; WOLFF, S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, Champaign, v. 26, n. 10, p. 853-856. 1991.

JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 202, n. 2, p. 384-389. 1992.

KAKUTA, I.; MURACHI, S. Physiological response of carp, *Cyprinus carpio*, exposed to raw sewage containing fish processing wastewater. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 12, n. 1, p. 1-9. 1997.

KAMP, G.; SCHMIDT, H.; STYPA, H.; FEIDEN, S.; MAHLING, C.; WEGENER, G. Regulatory properties of 6-phosphofructokinase and control of glycolysis in boar spermatozoa. **Reproduction**, Cambridge, v. 133, n. 1, p. 29-40. 2007.

KAWALL, H.; TORRES, J.; SIDELL, B.; SOMERO, G. Metabolic cold adaptation in Antarctic fishes: evidence from enzymatic activities of brain. **Marine Biology**, Berlin, v. 140, n. 2, p. 279-286. 2002.

KEJNA, M. Air temperature on King George Island, South Shetland Islands, Antarctica **Polish Polar Research**, Łódź, v. 20, n. 3, p. 183-201. 1999.

KEJNA, M. Topoclimatic conditions in the vicinity of the Arctowski Station (King George Island, Antarctica) during the summer season of 2006/2007. **Polish Polar Research**, Łódź, v. 29, n. 2, p. 95-116. 2008.

KENNETT, J. P. Cenozoic evolution of Antarctic glaciation, the circum-Antarctic oceans and their impact on global paleoceanography. **Journal of Geophysical Research**, Washington, v. 82, p. 3843-3859. 1977.

KENNICUTT II, M. C. Human contamination of the marine environment - Arthur Harbor and McMurdo sound, Antarctica. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 29, n. 5, p. 1279-1287. 1995.

KENNICUTT II, M. C.; MCDONALD, T. J.; DENOUEX, G. J.; MCDONALD, S. J. Hydrocarbon contamination on the antarctic peninsula. II. Arthur Harbor inter- and subtidal limpets (*Nacella concinna*). **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 24, n. 10, p. 506-511. 1992.

KENNICUTT II, M. C.; SWEET, S. T. Hydrocarbon contamination on the Antarctic peninsula: III. The Bahia Paraiso - Two years after the spill. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 25, n. 9-12, p. 303-306. 1992.

KENNICUTT, M. C.; SWEET, S. T.; FRASER, W. R.; STOCKTON, W. L.; CULVER, M. Grounding of the Bahia Paraiso at Arthur Harbor, Antarctica. 1. Distribution and fate of oil spill related hydrocarbons. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 25, n. 3, p. 509-518. 1991.

KHAIRY, M. A.; LUEK, J. L.; DICKHUT, R.; LOHMANN, R. Levels, sources and chemical fate of persistent organic pollutants in the atmosphere and snow along the western Antarctic Peninsula. **Environmental Pollution**, Barking, v. 216, p. 304-313. 2016.

KIM, D. **Seasonality of marine algae and grazers of an Antarctic rocky intertidal, with emphasis on the role of the limpet *Nacella concinna* Strebel (Gastropoda: Patellidae)**. 120 Berichte zur Polar- und Meeresforschung = Reports on polar and marine research, Bremen, Univ., Diss.2001

KINSEY, S. T.; HARDY, K. M.; LOCKE, B. R. The long and winding road: influences of intracellular metabolite diffusion on cellular organization and metabolism in skeletal muscle. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 210, n. 20, p. 3505-3512. 2007.

KONO, Y. Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 186, n. 1, p. 189-195. 1978.

KOURNOUTOU, G. G.; PYTHAROPOULOU, S.; LEOTSINIDIS, M.; KALPAXIS, D. L. Changes of polyamine pattern in digestive glands of mussel *Mytilus*

galloprovincialis under exposure to cadmium. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, New York, v. 165, p. 1-8. 2014.

KUKLINSKI, P.; BALAZY, P. Scale of temperature variability in the maritime Antarctic intertidal zone. **Journal of Sea Research**, Texel, v. 85, p. 542-546. 2014.

LAGABRIELLE, Y.; GODDÉRIIS, Y.; DONNADIEU, Y.; MALAVIEILLE, J.; SUAREZ, M. The tectonic history of Drake Passage and its possible impacts on global climate. **Earth and Planetary Science Letters**, Amsterdam, v. 279, n. 3-4, p. 197-211. 2009.

LANA, N. B.; BERTON, P.; COVACI, A.; CIOCCO, N. F.; BARRERA-ORO, E.; ATENCIO, A.; ALTAMIRANO, J. C. Fingerprint of persistent organic pollutants in tissues of Antarctic notothenioid fish. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 499, p. 89-98. 2014.

LANNIG, G.; STORCH, D.; PÖRTNER, H.-O. Aerobic mitochondrial capacities in Antarctic and temperate eelpout (Zoarcidae) subjected to warm versus cold acclimation. **Polar Biology**, New York, v. 28, n. 8, p. 575-584. 2005.

LARSEN, E. H.; DEATON, L. E.; ONKEN, H.; O'DONNELL, M.; GROSELL, M.; DANTZLER, W. H.; WEIHRAUCH, D. Osmoregulation and excretion. **Comprehensive Physiology**, New Jersey, v. 4, p. 405-573. 2014.

LEE, Y.-S.; JO, Y.-H.; HAN, Y.-S.; KHO, W.-G.; AHN, I.-Y.; JEONG, K.-H. Bioaccumulation of heavy metals in intestine of *Nacella concinna*. **The Korean Journal of Malacology**, South Korea, v. 22, n. 1, p. 87-95. 2006.

LENIHAN, H. S.; OLIVER, J. S. Anthropogenic and natural disturbances to marine benthic communities in Antarctica. **Ecological Applications**, Tempe, v. 5, n. 2, p. 311-326. 1995.

LENIHAN, H. S.; OLIVER, J. S.; OAKDEN, J. M.; STEPHENSON, M. D. Intense and localized benthic marine pollution around McMurdo Station, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 21, n. 9, p. 422-430. 1990.

LEVESQUE, H. M.; MOON, T. W.; CAMPBELL, P. G. C.; HONTELA, A. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 60, n. 3-4, p. 257-267. 2002.

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.-G.; AHN, B.-W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In: LESTER PACKER, A. N. G. (Ed.). **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, v.186, 1990, p.464-478.

LIN, C.-H.; YEH, P.-L.; LEE, T.-H. Ionic and amino acid regulation in Hard Clam (*Meretrix lusoria*) in response to salinity challenges. **Frontiers in Physiology**, Lausanne v. 7, p. 368. 2016.

LIU, X.; WANG, L.; LI, S.; HUO, Y.; HE, P.; ZHANG, Z. Quantitative distribution and functional groups of intertidal macrofaunal assemblages in Fildes Peninsula, King

George Island, South Shetland Islands, Southern Ocean. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 99, n. 1–2, p. 284-291. 2015.

LIVINGSTONE, D. R. Organic xenobiotics metabolism in marine invertebrates. In: GILLES, R. (Ed.). **Advances in comparative and environmental physiology**. Berlin: Springer, v.7, 1991, p.45-185.

LO GIUDICE, A.; CASELLA, P.; BRUNI, V.; MICHAUD, L. Response of bacterial isolates from Antarctic shallow sediments towards heavy metals, antibiotics and polychlorinated biphenyls. **Ecotoxicology**, Berlin, v. 22, n. 2, p. 240-250. 2013.

LOVETT, D. L.; WATTS, S. A. Changes in polyamine levels in response to acclimation salinity in gills of the blue crab *Callinectes sapidus rathbun*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 110, n. 1, p. 115-119. 1995.

LU, J.; SHI, Y.; WANG, S.; CHEN, H.; CAI, S.; FENG, J. NMR-based metabolomic analysis of *Halotis diversicolor* exposed to thermal and hypoxic stresses. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 545–546, p. 280-288. 2016.

LURMAN, G. J.; MACDONALD, J. A.; EVANS, C. W. Evaluating the impact of environmental pollution on fish in McMurdo Sound, Antarctica: A biomarker approach. **Polar Science**, Seattle, v. 3, n. 4, p. 246-253. 2010.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, Oxford, v. 143, p. 36-41. 2006.

MAFFIA, M.; ACIERNO, R.; DECEGLIE, G.; VILELLA, S.; STORELLI, C. Adaptation of intestinal cell membrane enzymes to low temperatures in the Antarctic teleost *Pagothenia bernacchii*. **Journal of Comparative Physiology B**, Berlin, v. 163, n. 4, p. 265-270. 1993.

MAGGINI, S.; STOECKLIN-TSCHAN, F. B.; MÖRIKOFER-ZWEZ, S.; WALTER, P. New kinetic parameters for rat liver arginase measured at near-physiological steady-state concentrations of arginine and Mn^{2+} . **Biochemical Journal**, London, v. 283, p. 653-660. 1992.

MARINO, T.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. What occurs by replacing Mn^{2+} with Co^{2+} in human arginase I: First-principles computational analysis. **Inorganic Chemistry**, Washington, v. 52, n. 2, p. 655-659. 2013.

MARKOWSKA, M.; KIDAWA, A. Encounters between Antarctic limpets, *Nacella concinna*, and predatory sea stars, *Lysasterias* sp., in laboratory and field experiments. **Marine Biology**, Berlin, v. 151, n. 5, p. 1959-1966. 2007.

MARTÍN, A.; MILOSLAVICH, P.; DÍAZ, Y.; ORTEGA, I.; KLEIN, E.; TRONCOSO, J.; ALDEA, C.; CARBONINI, A. K. Intertidal benthic communities associated with the macroalgae *Iridaea cordata* and *Adenocystis utricularis* in King George Island, Antarctica. **Polar Biology**, New York, v. 39, n. 2, p. 207-220. 2016.

MARTINS, C. C.; VENKATESAN, M. I.; MONTONE, R. C. Sterols and linear alkylbenzenes in marine sediments from Admiralty Bay, King George Island, South Shetland Islands. **Antarctic Science**, Cambridge, v. 14, n. 03, p. 244-252. 2002.

MARTINS, C. D. C.; MONTONE, R. C.; GAMBA, R. C.; PELLIZARI, V. H. Sterols and fecal indicator microorganisms in sediments from Admiralty Bay, Antarctica. **Brazilian Journal of Oceanography**, São Paulo, v. 53, p. 1-12. 2005.

MATKOVICS, B.; KECSKEMETI, V.; VARGA, S. I.; NOVAK, Z.; KERTESZ, Z. Antioxidant properties of DI- and polyamines. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 104, n. 3, p. 475-479. 1993.

MCGEE, D. J.; ZABALETA, J.; VIATOR, R. J.; TESTERMAN, T. L.; OCHOA, A. C.; MENDZ, G. L. Purification and characterization of *Helicobacter pylori* arginase, RocF: unique features among the arginase superfamily. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 271, n. 10, p. 1952-1962. 2004.

MEYER-ROCHOW, V. B. Observations on an accidental case of raw sewage pollution in Antarctica. **Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin = International journal of hygiene and environmental medicine**, Jena, v. 192, n. 6, p. 554-558. 1992.

MICHAUX, B. Reciprocity between biology and geology: Reconstructing polar Gondwana. **Gondwana Research**, Osaka, v. 16, n. 3-4, p. 655-668. 2009.

MICOL, T.; JOUVENTIN, P. Long-term population trends in seven Antarctic seabirds at Pointe Géologie (Terre Adélie) - Human impact compared with environmental change. **Polar Biology**, New York, v. 24, n. 3, p. 175-185. 2001.

MOINARD, C.; CYNOBER, L.; DE BANDT, J.-P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clinical Nutrition**, Pleasantville, v. 24, n. 2, p. 184-197. 2005.

MONTONE, R.; ALVAREZ, C.; BÍCEGO, M.; BRAGA, E.; BRITO, T. S.; CAMPOS, L.; FONTES, R. C.; CASTRO, B.; CORBISIER, T.; EVANGELISTA, H.; FRANCELINO, M.; GOMES, V.; ITO, R.; LAVRADO, H.; LEME, N.; MAHIQUES, M.; MARTINS, C.; NAKAYAMA, C.; NGAN, P.; PELLIZARI, V.; PEREIRA, A.; PETTI, M. V.; SANDER, M.; SCHAEFER, C. G. R.; WEBER, R. Environmental Assessment of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. In: VERDE, C. & DI PRISCO, G. (Ed.). **Adaptation and Evolution in Marine Environments, Volume 2**: Springer Berlin Heidelberg, cap. 9, 2013, p.157-175. (From Pole to Pole)

MONTONE, R. C.; MARTINS, C. C.; BÍCEGO, M. C.; TANIGUCHI, S.; ALBUQUERQUE MOREIRA DA SILVA, D.; CAMPOS, L. S.; WEBER, R. R. Distribution of sewage input in marine sediments around a maritime Antarctic research station indicated by molecular geochemical indicators. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 20, p. 4665-4671. 2010.

MONTONE, R. C.; TANIGUCHI, S.; COLABUONO, F. I.; MARTINS, C. C.; CIPRO, C. V. Z.; BARROSO, H. S.; DA SILVA, J.; BÍCEGO, M. C.; WEBER, R. R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay — An Antarctic specially managed area. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 106, n. 1–2, p. 377-382. 2016.

MONTONE, R. C.; TANIGUCHI, S.; WEBER, R. R. PCBs in the atmosphere of King George Island, Antarctica. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 308, n. 1–3, p. 167-173. 2003.

MORI, M.; GOTOH, T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 275, n. 3, p. 715-719. 2000.

MORLEY, S. A.; HIRSE, T.; PÖRTNER, H. O.; PECK, L. S. Geographical variation in thermal tolerance within Southern Ocean marine ectotherms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology**, New York, v. 153, n. 2, p. 154-161. 2009a.

MORLEY, S. A.; LEMMON, V.; OBERMÜLLER, B. E.; SPICER, J. I.; CLARK, M. S.; PECK, L. S. Duration tenacity: A method for assessing acclimatory capacity of the Antarctic limpet, *Nacella concinna*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 399, n. 1, p. 39-42. 2011.

MORLEY, S. A.; LURMAN, G. J.; SKEPPER, J. N.; PÖRTNER, H.-O.; PECK, L. S. Thermal plasticity of mitochondria: A latitudinal comparison between Southern Ocean molluscs. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 152, n. 3, p. 423-430. 2009b.

MULUKUTLA, B. C.; YONGKY, A.; DAOUIDIS, P.; HU, W.-S. Bistability in glycolysis pathway as a physiological switch in energy metabolism. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 6, p. e98756. 2014.

MUNAKATA, M.; NIINA, S.; UEDA, I. The role of metal ions in the activation of arginase. **Bioinorganic Chemistry**, New York, v. 6, n. 2, p. 133-142. 1976.

MURAEVA, O. A.; MALTSEVA, A. L.; MIKHAILOVA, N. A.; GRANOVITCH, A. I. Mechanisms of adaption to salinity stress in marine gastropods *Littorina saxatilis*: a proteomic analysis. **Cell and Tissue Biology**, Moscow, v. 10, n. 2, p. 160-169. 2016.

NAJLE, R.; ELISSONDO, M.; GENTILE, S.; GENTILE, M.; VACAREZZA, G.; SOLANA, H. Histopathology of the digestive gland of an Antarctic limpet exposed to cadmium. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 247, n. 2-3, p. 263-268. 2000.

NEGRI, A.; BURNS, K.; BOYLE, S.; BRINKMAN, D.; WEBSTER, N. Contamination in sediments, bivalves and sponges of McMurdo Sound, Antarctica. **Environmental Pollution**, Barking, v. 143, n. 3, p. 456-467. 2006.

NEMIROFF, R.; BONNELL, J. The coldest place on Earth. <http://apod.nasa.gov/apod/ap131211.html>, Data de acesso: 24 Novembro 2016. 2010.

NEWSHOLME, E. A.; START, C. **Regulation in Metabolism**. London: John Wiley & Sons, 349. 1973.

NICCHITTA, C. V.; ELLINGTON, W. R. Partial purification and characterization of a strombine dehydrogenase from the adductor muscle of the mussel *Modiolus squamosus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, Oxford, v. 77, n. 1, p. 233-236. 1984.

NIKAPITIYA, C.; KIM, W.-S.; PARK, K.; KWAK, I.-S. Identification of potential markers and sensitive tissues for low or high salinity stress in an intertidal mud crab (*Macrophthalmus japonicus*). **Fish & Shellfish Immunology**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 407-416. 2014.

NOLAN, C. P. Size, shape and shell morphology in the Antarctic limpet *Nacella concinna* at Signy island, South Orkney islands. **Journal of Molluscan Studies**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 225-238. 1991.

NUNEZ, M.; DAVIDSON, A. T.; MICHAEL, K. Modelled effects of ambient UV radiation on a natural Antarctic marine microbial community. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf/Luhe, v. 42, n. 1, p. 75-90. 2006.

OBERMÜLLER, B. E.; MORLEY, S. A.; CLARK, M. S.; BARNES, D. K. A.; PECK, L. S. Antarctic intertidal limpet ecophysiology: A winter-summer comparison. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 403, n. 1-2, p. 39-45. 2011.

PAGANI, M.; HUBER, M.; LIU, Z.; BOHATY, S. M.; HENDERIKS, J.; SIJP, W.; KRISHNAN, S.; DECONTO, R. M. The role of carbon dioxide during the onset of Antarctic glaciation. **Science**, Washington, v. 334, n. 6060, p. 1261-1264. 2011.

PAITAL, B.; CHAINY, G. B. N. Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, New York, v. 151, n. 1, p. 142-151. 2010.

PAKULSKI, J. D.; KASE, J. P.; MEADOR, J. A.; JEFFREY, W. H. Effect of stratospheric ozone depletion and enhanced ultraviolet radiation on marine bacteria at Palmer Station, Antarctica in the early austral spring. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 84, n. 1, p. 215-221. 2008.

PALACIOS, R.; HUITRÓN, C.; SOBERÓN, G. Studies on the advent of ureotelism. The effects of bivalent cations on the capacity of the hepatic arginase of the *Mexican axolotl* to hydrolyse endogenous arginine. **Biochemical Journal**, London, v. 114, n. 3, p. 449-454. 1969.

PALMGREN, H.; MCCAFFERTY, D.; ASPÁN, A.; BROMAN, T.; SELLIN, M.; WOLLIN, R.; BERGSTRÖM, S.; OLSEN, B. Salmonella in sub-Antarctica: low

heterogeneity in salmonella serotypes in South Georgian seals and birds. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 125, n. 2, p. 257-262. 2000.

PARK, H.; AHN, I.-Y.; KIM, H.; LEE, J.; SHIN, S. C. Glutathione S-transferase as a biomarker in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* after exposure to the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, New York, v. 150, n. 4, p. 528-536. 2009.

PAYNTER, K. T.; KARAM, G. A.; ELLIS, L. L.; BISHOP, S. H. Subcellular distribution of aminotransferases, and pyruvate branch point enzymes in gill tissue from four bivalves. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, Oxford, v. 82, n. 1, p. 129-132. 1985.

PECK, L. S. A cold limit to adaptation in the sea. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 13-26. 2016.

PECK, L. S.; CLARK, M. S.; MORLEY, S. A.; MASSEY, A.; ROSSETTI, H. Animal temperature limits and ecological relevance: Effects of size, activity and rates of change. **Functional Ecology**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 248-256. 2009.

PECK, L. S.; CONVEY, P.; BARNES, D. K. A. Environmental constraints on life histories in Antarctic ecosystems: Tempos, timings and predictability. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, Cambridge, v. 81, n. 1, p. 75-109. 2006.

PECK, L. S.; HEISER, S.; CLARK, M. S. Very slow embryonic and larval development in the Antarctic limpet *Nacella polaris*. **Polar Biology**, New York, p. 1-8. 2016.

PECK, L. S.; MORLEY, S. A.; RICHARD, J.; CLARK, M. S. Acclimation and thermal tolerance in Antarctic marine ectotherms. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 217, n. 1, p. 16-22. 2014.

PECK, L. S.; VEAL, R. Feeding, metabolism and growth in the Antarctic limpet, *Nacella concinna* (Strebel 1908). **Marine Biology**, Berlin, v. 138, n. 3, p. 553-560. 2001.

PECK, L. S.; WEBB, K. E.; BAILEY, D. M. Extreme sensitivity of biological function to temperature in Antarctic marine species. **Functional Ecology**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 625-630. 2004.

PEGG, A. E.; CASERO JR, R. A. Current status of the polyamine research field. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 720, p. 3-35. 2011.

PEROZICH, J.; HEMPEL, J.; MORRIS JR, S. M. Roles of conserved residues in the arginase family. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, Amsterdam, v. 1382, n. 1, p. 23-37. 1998.

PETER, H.; BRAUN, C.; JANOWSKI, S.; NORD, T. A.; NORDT, A.; STELTER, M. **The Current Environmental Situation and Proposals for the Management of the**

Fildes Peninsula Region. Federal Environment Agency. Berlin. 195 p. Data de acesso: 01 Agosto 2016. Disponível em: <http://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/461/publikationen/4424.pdf>. 2013.

PETTERSSON, M.; ADOLFSSON-ERICI, M.; PARKKONEN, J.; FÖRLIN, L.; ASPLUND, L. Fish bile used to detect estrogenic substances in treated sewage water. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 366, n. 1, p. 174-186. 2006.

PICKEN, G. B. The distribution, growth, and reproduction of the Antarctic limpet *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel, 1908). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 71-85. 1980.

PÖRTNER, H. O. Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation and thermal tolerance limits in animals. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 88, p. 137-146. 2001.

PÖRTNER, H. O. Environmental and functional limits to muscular exercise and body size in marine invertebrate athletes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 133, n. 2, p. 303-321. 2002.

PÖRTNER, H. O.; HARDEWIG, I.; PECK, L. S. Mitochondrial function and critical temperature in the Antarctic bivalve, *Laternula elliptica*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 124, n. 2, p. 179-189. 1999a.

PÖRTNER, H. O.; PECK, L.; ZIELINSKI, S.; CONWAY, L. Z. Intracellular pH and energy metabolism in the highly stenothermal Antarctic bivalve *Limopsis marionensis* as a function of ambient temperature. **Polar Biology**, New York, v. 22, n. 1, p. 17-30. 1999b.

PORTUGAL, T. R.; AKSNES, A. Arginase activity in different fish species and tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 15-16. 1983.

PROSS, J.; CONTRERAS, L.; BIJL, P. K.; GREENWOOD, D. R.; BOHATY, S. M.; SCHOUTEN, S.; BENDLE, J. A.; ROHL, U.; TAUXE, L.; RAINE, J. I.; HUCK, C. E.; VAN DE FLIERDT, T.; JAMIESON, S. S. R.; STICKLEY, C. E.; VAN DE SCHOOTBRUGGE, B.; ESCUTIA, C.; BRINKHUIS, H. Persistent near-tropical warmth on the Antarctic continent during the early Eocene epoch. **Nature**, London, v. 488, n. 7409, p. 73-77. 2012.

PUGH, P. J. A.; DAVENPORT, J. Colonisation vs. disturbance: the effects of sustained ice-scouring on intertidal communities. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 210, n. 1, p. 1-21. 1997.

PUPPO, J.; BLASCO, J. Partial characterization of alanine aminotransferase from gills and digestive gland of the bivalve *Ruditapes philippinarum*. **Comparative**

Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 111, n. 1, p. 99-109. 1995.

QUINLAN, G. J.; GUTTERIDGE, J. M. C. Carbonyl assay for oxidative damage to proteins. In: TANIGUSHI, N. & GUTTERIDGE, J. M. C. (Ed.). **Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species**. New York: Oxford University, 2000, p.257 - 258.

RAFFAELLI, D.; HAWKINS, S. Causes of zonation. In: (Ed.). **Intertidal Ecology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1999a, p.71-97.

RAFFAELLI, D.; HAWKINS, S. Human impact on the shore. In: (Ed.). **Intertidal Ecology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1999b, p.214-254.

RAFFAELLI, D.; HAWKINS, S. The shore environment: major gradients. In: (Ed.). **Intertidal Ecology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1999c, p.1-35.

RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. The hydrography of Admiralty Bay and its inlets, coves and lagoons (King George Island, Antarctica). **Polish Polar Research**, Łódź, v. 16, p. 61-70. 1995.

REGOLI, F.; PRINCIPATO, G. B.; BERTOLI, E.; NIGRO, M.; ORLANDO, E. Biochemical characterization of the antioxidant system in the scallop *Adamussium colbecki*, a sentinel organism for monitoring the Antarctic environment. **Polar Biology**, New York, v. 17, n. 3, p. 251-258. 1997.

REISS, P. M.; PIERCE, S. K.; BISHOP, S. H. Glutamate dehydrogenases from tissues of the ribbed mussel *Modiolus demissus*: ADP activation and possible physiological significance. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 202, n. 2, p. 253-257. 1977.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. In: LESTER, P. (Ed.). **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, v.233, 1994, p.357-363.

RIDER, J. E.; HACKER, A.; MACKINTOSH, C. A.; PEGG, A. E.; WOSTER, P. M.; CASERO JR, R. A. Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. **Amino Acids**, Vienna, v. 33, n. 2, p. 231-240. 2007.

RIGANTI, C.; GAZZANO, E.; POLIMENI, M.; ALDIERI, E.; GHIGO, D. The pentose phosphate pathway: An antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 53, n. 3, p. 421-436. 2012.

RIVA, S. D.; ABELMOSCHI, M. L.; MAGI, E.; SOGGIA, F. The utilization of the Antarctic environmental specimen bank (BCAA) in monitoring Cd and Hg in an Antarctic coastal area in Terra Nova Bay (Ross Sea—Northern Victoria Land). **Chemosphere**, Oxford, v. 56, n. 1, p. 59-69. 2004.

RIVERA-INGRAHAM, G. A.; NOMMICK, A.; BLONDEAU-BIDET, E.; LADURNER, P.; LIGNOT, J.-H. Salinity stress from the perspective of the energy-redox axis:

Lessons from a marine intertidal flatworm. **Redox Biology**, Amsterdam, v. 10, p. 53-64. 2016.

ROCHA, A. J. D. S.; BOTELHO, M. T.; HASUE, F. M.; PASSOS, M. J. D. A. C. R.; VIGNARDI, C. P.; NGAN, P. V.; GOMES, V. Genotoxicity of shallow waters near the Brazilian Antarctic Station "Comandante Ferraz" (EACF), Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Brazilian Journal of Oceanography**, São Paulo, v. 63, p. 63-70. 2015.

RODRIGUES, A. P.; OLIVEIRA, P. C.; GUILHERMINO, L.; GUIMARÃES, L. Effects of salinity stress on neurotransmission, energy metabolism, and anti-oxidant biomarkers of *Carcinus maenas* from two estuaries of the NW Iberian Peninsula. **Marine Biology**, Berlin, v. 159, n. 9, p. 2061-2074. 2012.

RODRIGUES, E.; GANNABATHULA, S. V.; LAVRADO, H. P. Nitrogen metabolism of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King & Broderip) and its potential use as biomarker. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 37-49. 2007.

RODRIGUES, E.; LAVRADO, H. P.; DONATTI, L.; SUDA, C. N. K.; RODRIGUES JUNIOR, E.; FEIJO DE OLIVEIRA, M.; GANNABATHULA SREE, V. Arginase kinetic characterization of the gastropod *Nacella concinna* and its physiological relation with energy requirement demand and the presence of heavy metal. **Annual Activity Report of National Institute of Science and Technology Antarctic Environmental Research**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 131-136. 2011.

RODRIGUES, E.; ROSA, R.; FUKUCHI, M.; NUMANAMI, H.; BACILA, M. The effect of temperature on the kinetic properties of phosphofructokinase and hexokinase from the antarctic fish *Trematomus bernacchii*. **Polar Biology**, New York, v. 7, p. 110-117. 1994.

RODRIGUES, E.; SANTOS, M. R. D. S.; RODRIGUES JUNIOR, E.; GANNABATHULA, S. V.; LAVRADO, H. P. Arginine metabolism of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King & Broderip, 1831): An ecophysiological approach. **Polar Biology**, New York, v. 32, n. 5, p. 691-702. 2009.

RODRIGUES JR, E. **Efeito de fatores naturais e antrópicos sobre o metabolismo de nototeniídeos antárticos**. 143 Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2015

RODRIGUES JR., E.; FEIJÓ-OLIVEIRA, M.; SUDA, C. N. K.; VANI, G. S.; DONATTI, L.; RODRIGUES, E.; LAVRADO, H. P. Metabolic responses of the Antarctic fishes *Notothernia rossii* and *Notothernia coriiceps* to sewage pollution. **Fish Physiology and Biochemistry**, Berlin, p. 1-16. 2015.

RODRIGUES JR., E.; FEIJÓ-OLIVEIRA, M.; VANI, G. S.; SUDA, C. N. K.; CARVALHO, C. S.; DONATTI, L.; LAVRADO, H. P.; RODRIGUES, E. Interaction of warm acclimation, low salinity, and trophic fluoride on plasmatic constituents of the Antarctic fish *Notothernia rossii* (Richardson, 1844). **Fish Physiology and Biochemistry**, Berlin, v. 39, n. 6, p. 1591-1601. 2013.

ROYER, D. L. CO₂-forced climate thresholds during the Phanerozoic. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, London, v. 70, n. 23, p. 5665-5675. 2006.

RUNCIE, J. W.; RIDDLE, M. J. Metal concentrations in macroalgae from East Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 49, n. 11-12, p. 1114-1119. 2004.

SABOROWSKI, R.; BUCHHOLZ, F. Metabolic properties of Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, from different climatic zones. II. Enzyme characteristics and activities. **Marine Biology**, Berlin, v. 140, n. 3, p. 557-565. 2002.

SÁENZ, L. A.; SEIBERT, E. L.; ZANETTE, J.; FIEDLER, H. D.; CURTIUS, A. J.; FERREIRA, J. F.; ALVES DE ALMEIDA, E.; MARQUES, M. R. F.; BAINY, A. C. D. Biochemical biomarkers and metals in *Perna perna* mussels from mariculture zones of Santa Catarina, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 73, n. 5, p. 796-804. 2010.

SAMSON, M.-L. *Drosophila* arginase is produced from a nonvital gene that contains the elav locus within its third intron. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, n. 40, p. 31107-31114. 2000.

SANTOS, I. R.; SILVA-FILHO, E. V.; SCHAEFER, C.; MARIA SELLA, S.; SILVA, C. A.; GOMES, V.; PASSOS, M. J. D. A. C. R.; VAN NGAN, P. Baseline mercury and zinc concentrations in terrestrial and coastal organisms of Admiralty Bay, Antarctica. **Environmental Pollution**, Barking, v. 140, n. 2, p. 304-311. 2006.

SANTOS, I. R.; SILVA-FILHO, E. V.; SCHAEFER, C. E. G. R.; ALBUQUERQUE-FILHO, M. R.; CAMPOS, L. S. Heavy metal contamination in coastal sediments and soils near the Brazilian Antarctic Station, King George Island. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 185-194. 2005.

SEGEL, I. H. **Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems**. New York: Wiley & Sons Inc., 992. 1993.

SEGOVIA-RIVERA, V.; VALDIVIA, N. Independent effects of grazing and tide pool habitats on the early colonisation of an intertidal community on western Antarctic Peninsula. **Revista Chilena de Historia Natural**, Santiago do Chile, v. 89, n. 1, p. 1-9. 2016.

SETZER, A. W.; OLIVEIRA, M. R.; FRANCELINO, M. R.; SCHAEFER, C. E. G. R.; COSTA, L. M. B., U. F. Regime Climático na Baía do Almirantado: Relações com o Ecossistema Terrestre. In: SCHAEFER, C. E. G. R. (Ed.). **Ecossistemas Costeiros e Monitoramento Ambiental da Antártica Marinha – Baía do Almirantado, Ilha Rei George**. Viçosa: Núcleo de Estudo de Planejamento e Uso da Terra – NEPUT, 2004, p.2-6.

SHABICA, S. V. **The natural history of the Antarctic limpet *Patinigera polaris* (Hombron and Jacquinot)**. 294 Oregon State University, Oregon. 1976

SHARMA, B.; SINGH, S.; SIDDIQI, N. J. Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems. **BioMed Research International**, Cairo, v. 2014, p. 26. 2014.

SHI, H.; SUI, Y.; WANG, X.; LUO, Y.; JI, L. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, New York, v. 140, n. 1, p. 115-121. 2005.

SHIN, S. C.; KIM, S. J.; LEE, J. K.; AHN, D. H.; KIM, M. G.; LEE, H.; LEE, J.; KIM, B.-K.; PARK, H. Transcriptomics and comparative analysis of three antarctic Notothenioid fishes. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 8, p. e43762. 2012.

SICIŃSKI, J.; JAZDZEWSKI, K.; BROYER, C. D.; PRESLER, P.; LIGOWSKI, R.; NONATO, E. F.; CORBISIER, T. N.; PETTI, M. A. V.; BRITO, T. A. S.; LAVRADO, H. P.; BLAZEWICZ-PASZKOWYCZ, M.; PABIS, K.; JAZDZEWSKA, A.; CAMPOS, L. S. Admiralty Bay Benthos Diversity - A census of a complex polar ecosystem. **Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, Oxford, v. 58, n. 1-2, p. 30-48. 2011.

SIEGERT, M. J.; FLORINDO, F. Antarctic Climate Evolution. In: FABIO, F. & MARTIN, S. (Ed.). **Developments in Earth and Environmental Sciences**. Maryland Heights: Elsevier, v.8, 2008, p.1-11.

SIMPFENDÖRFER, R. W.; OELCKERS, K. B.; LÓPEZ, D. A. Phosphofructokinase from muscle of the marine giant barnacle *Austromegabalanus psittacus*: Kinetic characterization and effect of in vitro phosphorylation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, Oxford, v. 142, n. 3-4, p. 382-389. 2006.

SMITH, S. D. A.; SIMPSON, R. D. Spatial variation in the community structure of intertidal habitats at Macquarie Island (sub-Antarctic). **Antarctic Science**, Cambridge, v. 14, n. 4, p. 374-384. 2002.

SOKOLOVA, I. M.; FREDERICH, M.; BAGWE, R.; LANNIG, G.; SUKHOTIN, A. A. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 79, n. 0, p. 1-15. 2012.

SOLOMON, S.; IVY, D. J.; KINNISON, D.; MILLS, M. J.; NEELY, R. R.; SCHMIDT, A. Emergence of healing in the Antarctic ozone layer. **Science**, Washington, v. 353, n. 6296, p. 269-274. 2016.

SOMERO, G. N. Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic "strategies". **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 139, n. 3, p. 321-333. 2004.

SRIVASTAVA, S.; RATHA, B. K. Unique hepatic cytosolic arginase evolved independently in ureogenic freshwater air-breathing teleost, *Heteropneustes fossilis*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 6, p. e66057. 2013a.

SRIVASTAVA, S.; RATHA, B. K. Unusual hepatic mitochondrial arginase in an Indian air-breathing teleost, *Heteropneustes fossilis*: Purification and characterization.

Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, New York, v. 164, n. 2, p. 133-141. 2013b.

STANWELL-SMITH, D.; CLARKE, A. The timing of reproduction in the Antarctic limpet *Nacella concinna* (Strebel, 1908) (Patellidae) at Signy Island, in relation to environmental variables. **Journal of Molluscan Studies**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 123-127. 1998.

STARK, J. S.; KIM, S. L.; OLIVER, J. S. Anthropogenic disturbance and biodiversity of marine benthic communities in Antarctica: A regional comparison. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 6, p. e98802. 2014.

STARK, J. S.; SMITH, J.; KING, C. K.; LINDSAY, M.; STARK, S.; PALMER, A. S.; SNAPE, I.; BRIDGEN, P.; RIDDLE, M. Physical, chemical, biological and ecotoxicological properties of wastewater discharged from Davis Station, Antarctica. **Cold Regions Science and Technology**, Amsterdam, v. 113, p. 52-62. 2015.

STONE, E. M.; GLAZER, E. S.; CHANTRANUPONG, L.; CHERUKURI, P.; BREECE, R. M.; TIERNEY, D. L.; CURLEY, S. A.; IVERSON, B. L.; GEORGIU, G. Replacing Mn^{2+} with Co^{2+} in human arginase I enhances cytotoxicity toward L-arginine auxotrophic cancer cell lines. **ACS Chemical Biology**, Washington, v. 5, n. 3, p. 333-342. 2010.

STRAHL, J.; DRINGEN, R.; SCHMIDT, M. M.; HARDENBERG, S.; ABELE, D. Metabolic and physiological responses in tissues of the long-lived bivalve *Arctica islandica* to oxygen deficiency. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 158, n. 4, p. 513-519. 2011.

STROBEL, A.; BURKHARDT-HOLM, P.; SCHMID, P.; SEGNER, H. Benzo(a)pyrene metabolism and EROD and GST biotransformation activity in the liver of red- and white-blooded antarctic fish. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 49, n. 13, p. 8022-8032. 2015.

SUDA, C. N. K.; VANI, G. S.; DE OLIVEIRA, M. F.; RODRIGUES JR., E.; RODRIGUES, E.; LAVRADO, H. P. The biology and ecology of the Antarctic limpet *Nacella concinna*. **Polar Biology**, New York, v. 38, n. 12, p. 1949-1969. 2015.

SUMMERHAYES, C. P. International collaboration in Antarctica: the International Polar Years, the International Geophysical Year, and the Scientific Committee on Antarctic Research. **Polar Record**, Cambridge, v. 44, n. 4, p. 321-334. 2008.

TAKEUCHI, M.; MIZUTA, C.; UDA, K.; FUJIMOTO, N.; OKAMOTO, M.; SUZUKI, T. Unique evolution of Bivalvia arginine kinases. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, Basel, v. 61, n. 1, p. 110-117. 2004.

THUESEN, E. V.; MCCULLOUGH, K. D.; CHILDRESS, J. J. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, Plymouth, v. 85, n. 03, p. 603-611. 2005.

TIN, T.; LAMERS, M.; LIGGETT, D.; MAHER, P. T.; HUGHES, K. A. Setting the Scene: Human Activities, Environmental Impacts and Governance Arrangements in Antarctica. In: TIN, T.; LIGGETT, D.; MAHER, T. P. & LAMERS, M. (Ed.). **Antarctic Futures: Human Engagement with the Antarctic Environment**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014, p.1-24.

TORMANEN, C. D. The effect of metal ions on arginase from the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 66, n. 2, p. 111-118. 1997.

TORMANEN, C. D. Allosteric inhibition of rat liver and kidney arginase by copper and mercury ions. **Journal of Enzyme Inhibition**, Chur, v. 16, n. 5, p. 443-449. 2001.

TORRES, J. J.; GRIGSBY, M. D.; ELIZABETH CLARKE, M. Aerobic and anaerobic metabolism in oxygen minimum layer fishes: The role of alcohol dehydrogenase. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 215, n. 11, p. 1905-1914. 2012.

TORRES, M. A.; BARROS, M. P.; CAMPOS, S. C. G.; PINTO, E.; RAJAMANI, S.; SAYRE, R. T.; COLEPICOLO, P. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 71, n. 1, p. 1-15. 2008.

TREBERG, J. R.; MACCORMACK, T. J.; LEWIS, J. M.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L.; DRIEDZIC, W. R. Intracellular glucose and binding of hexokinase and phosphofructokinase to particulate fractions increase under hypoxia in heart of the amazonian armored catfish (*Liposarcus pardalis*). **Physiological and Biochemical Zoology**, Chicago, v. 80, n. 5, p. 542-550. 2007.

TREVIZANI, T. H.; FIGUEIRA, R. C. L.; RIBEIRO, A. P.; THEOPHILO, C. Y. S.; MAJER, A. P.; PETTI, M. A. V.; CORBISIER, T. N.; MONTONE, R. C. Bioaccumulation of heavy metals in marine organisms and sediments from Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 106, n. 1-2, p. 366-371. 2016.

TSAL, C.-J.; MAIZEL, J. V.; NUSSINOV, R. The hydrophobic effect: A new insight from cold denaturation and a two-state water structure. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 37, n. 2, p. 55-69. 2002.

TURNER, J. Arctic and Antarctic | Antarctic Climate In: PYLE, J. & ZHANG, F. (Ed.). **Encyclopedia of Atmospheric Sciences**. Second edition. Oxford: Academic Press, 2015, p.98-106.

TURNER, J.; BINDSCHADLER, R.; CONVEY, P.; DI PRISCO, G.; FAHRBACH, E.; GUTT, J.; HODGSON, D.; MAYEWSKI, P.; SUMMERHAYES, C. **Antarctic Climate Change and the Environment**. Cambridge, UK: Scientific Committee on Antarctic Research, 526. 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Exeter, v. 39, n. 1, p. 44-84. 2007.

VAN NGAN, P.; GOMES, V.; PASSOS, M.; USSAMI, K.; CAMPOS, D.; ROCHA, A.; PEREIRA, B. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station "Comandante Ferraz," King George Island. **Polar Biology**, New York, v. 30, n. 2, p. 209-217. 2007.

VECCHIATO, M.; ARGIRIADIS, E.; ZAMBON, S.; BARBANTE, C.; TOSCANO, G.; GAMBARO, A.; PIAZZA, R. Persistent Organic Pollutants (POPs) in Antarctica: Occurrence in continental and coastal surface snow. **Microchemical Journal**, New York, v. 119, p. 75-82. 2015.

VELEZ, C.; FIGUEIRA, E.; SOARES, A. M. V. M.; FREITAS, R. Native and introduced clams biochemical responses to salinity and pH changes. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 566–567, p. 260-268. 2016.

VERDE, C.; GIORDANO, D.; DI PRISCO, G. The adaptation of polar fishes to climatic changes: Structure, function and phylogeny of haemoglobin. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology life**, Hoboken, v. 60, n. 1, p. 29-40. 2008.

VERDE, C.; PARISI, E.; DI PRISCO, G. The evolution of thermal adaptation in polar fish. **Gene**, Maryland Heights, v. 385, p. 137-145. 2006.

VERLECAR, X. N.; JENA, K. B.; CHAINY, G. B. N. Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, v. 76, n. 4, p. 745-752. 2008.

VIARENGO, A.; NOTT, J. A. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, Oxford, v. 104, n. 3, p. 355-372. 1993.

VINAGRE, C.; MADEIRA, D.; MENDONÇA, V.; DIAS, M.; ROMA, J.; DINIZ, M. S. Effect of temperature in multiple biomarkers of oxidative stress in coastal shrimp. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 41, n. 0, p. 38-42. 2014.

VINU CHANDRAN, R. **Intracellular osmoregulation in the estuarine mollusc *Villorita cyprinoides* Var. *cochinensis* (Mollusca: Bivalvia)** Hanley 143 Department of Marine Biology, Microbiology and Biochemistry, Cochin University of Science and Technology, Kochi, India. 2002

WALLER, C. L. Variability in intertidal communities along a latitudinal gradient in the Southern Ocean. **Polar Biology**, New York, v. 31, n. 7, p. 809-816. 2008.

WALLER, C. L.; BARNES, D. K. A.; CONVEY, P. Ecological contrasts across an Antarctic land-sea interface. **Austral Ecology**, Carlton, v. 31, n. 5, p. 656-666. 2006a.

WALLER, C. L.; WORLAND, M. R.; CONVEY, P.; BARNES, D. K. A. Ecophysiological strategies of Antarctic intertidal invertebrates faced with freezing stress. **Polar Biology**, New York, v. 29, n. 12, p. 1077-1083. 2006b.

WAN, R.; MENG, F.; FU, W.; WANG, Q.; SU, E. Biochemical responses in the gills of *Meretrix meretrix* after exposure to treated municipal effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 111, n. 0, p. 78-85. 2015.

WARREN, G. B.; TIPTON, K. F. Pig liver pyruvate carboxylase. Purification, properties and cation specificity. **Biochemical Journal**, London, v. 139, n. 2, p. 297-310. 1974.

WEIHE, E. **Adaptation and stress defence in intertidal and subtidal Antarctic limpets (*Nacella concinna*): A study of the plasticity of molecular and biochemical stress response in Antarctic invertebrates**. 135 Universitat Bremen, Bremen. 2009

WEIHE, E.; ABELE, D. Differences in the physiological response of inter- and subtidal Antarctic limpets *Nacella concinna* to aerial exposure. **Aquatic Biology**, Oldendorf/Luhe, v. 4, n. 2, p. 155-166. 2008.

WEIHE, E.; KRIEWS, M.; ABELE, D. Differences in heavy metal concentrations and in the response of the antioxidant system to hypoxia and air exposure in the Antarctic limpet *Nacella concinna*. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 69, n. 3, p. 127-135. 2010.

WEXLER, H. Antarctic Research During the International Geophysical Year. In: CRARY, A. P.; GOULD, L. M.; HULBURT, E. O.; ODISHAW, H. & SMITH, W. E. (Ed.). **Antarctica in the International Geophysical Year: Based on a Symposium on the Antarctic**. Washington: American Geophysical Union, 1956, p.7-12.

WICKES, M. A.; MORGAN II, R. P. Effects of salinity on three enzymes involved in amino acid metabolism from the American oyster, *Crassostrea virginica*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, Oxford, v. 53, n. 3, p. 339-343. 1976.

WIESE, T. J.; LAMBETH, D. O.; RAY, P. D. The intracellular distribution and activities of phosphoenolpyruvate carboxykinase isozymes in various tissues of several mammals and birds. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, Oxford, v. 100, n. 2, p. 297-302. 1991.

WIESER, W.; PLATZER, U. A novel metabolic response to anoxia in an invertebrate the snail *Helix pomatia* involving the reaction catalyzed by arginase (EC 3.5.3.1). **Molecular Physiology**, Amsterdam, v. 4, n. 3-4, p. 155-164. 1983.

WILLIAMS, R. J. P.; FRAUSTO DA SILVA, J. J. R. The distribution of elements in cells. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 200-202, p. 247-348. 2000.

WOLSCHKE, H.; MENG, X.-Z.; XIE, Z.; EBINGHAUS, R.; CAI, M. Novel flame retardants (N-FRs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (DL-PCBs) in fish, penguin, and skua from King George

Island, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 96, n. 1–2, p. 513-518. 2015.

WU, G.; MORRIS, S. M., JR. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemical Journal**, London, v. 336, p. 1-17. 1998.

YANCEY, P.; CLARK, M.; HAND, S.; BOWLUS, R.; SOMERO, G. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**, Washington, v. 217, n. 4566, p. 1214-1222. 1982.

YANCEY, P. H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 208, n. 15, p. 2819-2830. 2005.

YATIN, M. Polyamines in living organisms. **Journal of Cell and Molecular Biology**, Istanbul, v. 1, p. 57-67. 2002.

ZACHER, K.; HANELT, D.; WIENCKE, C.; WULFF, A. Grazing and UV radiation effects on an Antarctic intertidal microalgal assemblage: A long-term field study. **Polar Biology**, New York, v. 30, n. 9, p. 1203-1212. 2007a.

ZACHER, K.; WULFF, A.; MOLIS, M.; HANELT, D.; WIENCKE, C. Ultraviolet radiation and consumer effects on a field-grown intertidal macroalgal assemblage in Antarctica. **Global Change Biology**, Oxford, v. 13, n. 6, p. 1201-1215. 2007b.

ZURBURG, W.; DE ZWAAN, A. The role of amino acids in anaerobiosis and osmoregulation in bivalves. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 215, n. 3, p. 315-325. 1981.